

# 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

**EFFECTO DEL CULTIVO EN TRES DIMENSIONES (3D) ORGANOTIPICO EN EL  
TRANSCRIPTOMA DE ARNm Y LA RESPUESTA A LA TERAPIA  
FARMACOLÓGICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2+**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA

**LUIS FERNANDO DÍAZ MARTÍNEZ**

DIRECTOR

**DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO**

CODIRECTOR

**DR. ROSALIO RAMOS PAYÁN**

**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, noviembre 2023

## 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 (UACM).

Secretario: Dr. Mario César López Camarillo (UACM).

Vocal: Dra. Helena Solleiro Villavicencio (UACM).

1<sup>er</sup> Suplente: Dra Ángeles Concepción Tecalco Cruz (UACM).

Plantel de adscripción:

**PLANTEL DEL VALLE, UACM**

**DIRECTOR**



---

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

**CODIRECTOR**



---

**Dr. Rosalio Ramos Payán**  
Universidad Autónoma de Sinaloa



## **COMITÉ TUTORAL:**

DIRECTOR

**Dr. Mario César López Camarillo**

Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

**Dr. Rosalio Ramos Payán**

Profesor Investigador, Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Universidad Autónoma de Sinaloa

ASESORAS

**Dra. Ma. Elizabeth Álvarez Sánchez**

Profesora Investigadora, Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz**

Profesora Investigadora, Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**M.C. Mireya Cisneros Villanueva**

Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar, a las instituciones responsables para que este proyecto se pudiera llevar a cabo; a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México con la cual adquirí el compromiso en mi calidad de estudiante en esta casa de estudios y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado mediante la beca de estudiante de posgrado número 781391 la cual me permitió sobrellevar mi estancia en la maestría.

En segundo lugar, al Dr. Alfredo Hidalgo y a la Dra. Mireya Cisneros del laboratorio de genómica el cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por apoyarnos para llevar a cabo el ensayo de microarreglos.

Al laboratorio de medicina traslacional del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por brindarme lugar en su laboratorio para la implementación de los cultivos 3D.

Al laboratorio de oncogenómica y oncoproteómica del cáncer de mama del Dr. César López Camarillo, por haberme aceptado para realizar mi proyecto de maestría.

Al Dr. Rosalio Ramos Payán de la facultad de ciencias químico biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

De manera personal, agradezco enormemente el apoyo y la paciencia que me brindo la Dra. Olguita para que este proyecto se pudiera llevar a cabo.

A Marthita, Jaqueline e Iraiz por hacer que los días fueran más llevaderos.

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología CONAHCyT, en la Convocatoria Fronteras de la Ciencia (F003 #51207/2020).

## **DEDICATORIAS.**

A Alex y Yeka por ser mi pilar de cada día, los amo.

# ÍNDICE

INTEGRACIÓN DEL JURADO.....	2
COMITÉ TUTORAL: .....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIAS.....	6
ÍNDICE .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	13
ABREVIATURAS.....	14
1. RESUMEN.....	16
2. ABSTRACT .....	17
3. INTRODUCCIÓN.....	18
3.1 Cáncer de mama .....	20
3.2 Tipos de cáncer de mama más frecuentes.....	23
3.3 Clasificación molecular del cáncer de mama.....	24
3.4 Ciclo celular .....	27
3.5 Perfil transcripcional.....	30
3.6 Mecanismos de resistencia a la terapia farmacológica .....	31
4 ANTECEDENTES PARTICULARES .....	33
4.1 Cáncer de mama HER2+.....	33
4.2 Cultivos bidimensionales (2D) vs cultivos tridimensionales (3D).....	37
4.3 Cultivos en 3D.....	39
4.4 Morfología de los cultivos en 3D.....	41
4.5 Resistencia a terapia mediada por transportadores.....	43

5. HIPÓTESIS .....	45
6. JUSTIFICACIÓN .....	45
7. OBJETIVOS .....	46
7.1 General.....	46
7.2 Particulares.....	46
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. ....	47
9. MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
9.1 Cultivos de células en 2D y en 3D.....	48
9.2 Extracción de RNA total.....	48
9.3 Ensayo de microarreglos. ....	49
9.4 Análisis bioinformático de los genes modulados. ....	50
9.5 Análisis de expresión del gen ABCB10.....	50
9.6 Ensayo de transfección del siRNA. ....	51
9.7 Análisis de la inhibición de la proteína ABCB10 en células BT474 por Western Blot. ....	53
9.8 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de células BT474 tratadas a diferentes concentraciones de cisplatino.....	54
9.9 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA para ABCB10 y posteriormente tratadas con cisplatino.....	55
10. RESULTADOS.....	58
10.1 Establecimiento de cultivos 2D y 3D de la línea celular BT474 .....	58
10.2 Análisis morfológico y estructural de los esferoides. ....	59
10.3 Determinación de cambios en la expresión global de genes a nivel de RNAm en células BT474 crecidas en 2D vs 3D.....	61
10.4 Análisis bioinformático de los RNA´s mensajeros diferencialmente expresados. ....	70
10.5 Rutas y vías de señalización asociados a <i>hallmarks</i> del cáncer .....	72

10.6 Identificación de RNA's mensajeros sobreexpresados en 3D y asociados a resistencia a terapia. ....	74
10.7 Análisis de expresión del gen ABCB10 en células BT474 cultivadas en 2D y 3D. ....	76
10.8 Análisis de inhibición del gen ABCB10 en células BT474 .....	79
10.9 Análisis de inhibición de la proteína ABCB10 por Western Blot (WB) .....	80
10.10 Ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las células BT474 tratadas con cisplatino.....	82
10.11 Determinación de la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA para el gen ABCB10.....	83
.....	84
11. DISCUSIÓN. ....	85
12. CONCLUSIONES.....	89
13. BIBLIOGRAFÍA. ....	90
14. ANEXOS. ....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig 1. Tasas de incidencia y mortalidad por tipos de cáncer en mujeres durante el año 2020.....	19
Fig. 2. Anatomía de la glándula mamaria.....	21
Fig. 3 Anatomía de la mama con carcinoma lobular invasivo.....	22
Fig. 4 Marcadores moleculares más usados en CM.....	26
Fig. 5 Esquema del ciclo celular normal.....	28
Fig. 6. Vías de activación mediadas por miembros de la familia HER.....	34
Fig. 7 Vía PI3K/Akt/mTOR activada por HER2. ....	35
Fig. 8 Modelos 2D y 3D de cultivo celular mamario.....	38
Fig. 9 Estructura de un esferoide multicelular.....	40
Fig. 10 Clasificación morfológica de líneas celulares de mama cultivadas en 3D.....	42
Fig. 11 Estructuras esquemáticas de los transportadores tipo ABC.....	44
Fig. 12 Esquema del ensayo de transfección usando lipofectamina.....	52
Fig. 13 Ensayo de MTT.....	54
Fig. 14 Resultados de los cultivos de la línea celular BT-474 a las 4, 24, 72 y 120 hrs.....	58
Fig. 15 Integridad de RNA.....	61
Fig. 16 Total de genes diferencialmente expresados en nuestro análisis 3D vs 2D.....	65
Fig. 17 Esquema de trabajo de filtraje.....	66
Fig. 18 Heat Map.....	68
Fig. 19 Volcano Plot.....	69
Fig. 20 Diagrama de flujo para el análisis de los RNA´s mensajeros diferencialmente expresados. ....	70

Fig. 21 Análisis de vías de enriquecimiento de los RNA´s mensajeros sobreexpresados en 3D. ....	73
Fig. 22 Secuencias de oligonucleótidos dirigidas a las variantes del gen ABCB10...76	
Fig. 23 Gel de agarosa al 3% en donde se corrieron las muestras de nuestro ensayo de qRT-PCR.....	77
Fig. 24 Resultados del ensayo de inhibición de la proteína ABCB10 mediante WB....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación molecular del CM.....	24
Tabla 2. Condiciones y volúmenes usados para el ensayo de transfección.....	56
Tabla 3. Cuantificación de las muestras de RNA.....	62
Tabla 4. Lista de genes (RNAm) asociados a resistencia a terapia. .....	74
Tabla 5. Lista de genes (RNAm) con un valor de AUC > 6. ....	75

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Diámetro de esferoides.....	59
Gráfica 2. Número de esferoides.....	60
Gráfica 3. Electroferograma 1_3D.....	63
Gráfica 4. Electroferograma 2_3D.....	63
Gráfica 5. Electroferograma 3_3D.....	63
Gráfica 6. Electroferograma 1_2D.....	64
Gráfica 7. Electroferograma 2_2D.....	64
Gráfica 8. Electroferograma 3_2D.....	64
Gráfica 9. Total de RNA's mensajeros filtrados y considerados como diferencialmente expresados en cultivos 3D vs 2D. ....	67
Gráfica 10. Análisis de Gen Ontology (GO). ....	72
Gráfica 11. Expresión diferencial del gen ABCB10 en células cultivadas en 2D y 3D. ....	78
Gráfica 12. Resultados del ensayo de inhibición del gen ABCB10 mediante qRT-PCR.....	79
Gráfica 13. Resultados del análisis densitométrico del ensayo de Western Blot (WB).....	81
Gráfica 14. IC50 de las células BT474 tratadas a diferentes concentraciones de cisplatino.....	82
Gráfica 15. Resultados del ensayo de MTT y qRT-PCR para evaluar la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA y tratadas con cisplatino.....	84

## **ABREVIATURAS.**

**AKT**- Serina/treonina cinasa 1

**ATP**- Adenosín Trifosfato

**CC**- Ciclo celular

**CDK**- Proteína cinasa dependiente de kinasa

**cDNA**- DNA complementario

**CLIS**- Carcinoma lobular *in-situ*

**CM**- Cáncer de mama

**C-MYC**- Protooncogén MYC

**cRNA**- RNA complementario

**DCIS**- Carcinoma ductal *in-situ*

**DNA**- Ácido desoxirribonucleico

**dNTP**- Desoxinucleótido trifosfato

**dTTP**- Desoxiribosa timina trifosfato

**dUTP**- Desoxiuridina trifosfato

**EGF**- Factor de crecimiento endotelial

**FGF**- Factor de crecimiento de fibroblástico

**GO**- Gene Ontology

**HER-1**- Factor de crecimiento epidérmico humano 1

**HER-2**- Factor de crecimiento epidérmico humano 2

**HER-3**- Factor de crecimiento epidérmico humano 3

**HER-4**- Factor de crecimiento epidérmico humano 4

**IDC**- Carcinoma ductal invasivo

**ILC**- Carcinoma lobular invasivo

**LCIS**- Carcinoma lobular *in-situ*

**MAPK**- Proteína kinasa activada por mitógenos

**MDR**- Resistencia a múltiples drogas

**MEC**- Matriz extracelular

**mTOR**- objetivo mecanicista de la rapamicina cinasa

**NBD**- Dominio de unión a nucleótido  
**PKC**- Proteína kinasa C  
**PTEN**- homólogo de fosfatasa y tensina  
**RE**- Receptor de estrógenos  
**RIN**- RNA integrity number  
**RNA**- Ácido ribonucleico  
**RNA<sub>m</sub>**- RNA mensajero  
**RP**- Receptor de progesterona  
**RTK's**- Receptores tirosina cinasa  
**SFB**- Suero fetal bovino  
**TMD**- Dominio transmembrana  
**TNBC**- Cáncer de mama triple negativo  
**VEGF**- Factor de crecimiento vascular endotelial  
**WB**- Western blot  
**PBS**- Solución salina de buffer-fosfato  
**TNTE**- Solución salina de buffer de extracción  
**PI3K**- Fosfatidilinositol 1-4,5-bifosfato3-cinasa  
**2D**- Cultivo bidimensional  
**3D**- Cultivo tridimensional

## 1. RESUMEN

Los tumores mamarios malignos HER2+, constiyuyen un tipo de cáncer de mama (CM) que se caracteriza por la amplificación del gen que codifica para esta proteína. HER2 es una oncoproteína que participa en la regulación del crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular (Iqbal, 2014). Aunque, las terapias anticancerígenas van dirigidas dependiendo las características moleculares del tumor, las pacientes eventualmente se vuelven resistentes al tratamiento (Gottesman M, 2002). Actualmente, se ha demostrado que los cultivos 3D emulan mejor las características de los tumores formados en condiciones fisiológicas, debido a esto se utilizaron como modelo de estudios en este proyecto. El objetivo de este trabajo fue comparar la expresión diferencial de una línea celular de CM HER2+ en dos tipos de condiciones de cultivo; un modelo tradicional en monocapa y un cultivo tridimensional (3D), nuestra hipótesis es que este último tenga un perfil transcripcional más allegado al de un tumor *in-vivo*. y por lo tanto pueda estar expresando genes que le confieran resistencia a la terapia farmacológica. Primeramente, se realizó un ensayo de microarreglos para evaluar la expresión diferencial de ARNm en ambos tipos de cultivo. Los datos muestran que 2870 genes fueron sobreexpresados y 1943 reprimidos en las células crecidas en 3D en comparación con los cultivos en 2D. El análisis bioinformático identificó genes asociados a la resistencia a quimioterapia, que se sobreexpresaron en la condición 3D con respecto a 2D, resaltando el papel de algunos transportadores tipo ABC. Nuestros análisis posteriores identificaron al transportador ABCB10 como un candidato potencial para análisis funcionales. Se diseñaron primers para validar su expresión en cultivos 2D y 3D y se confirmó su sobreexpresión en 3D, posteriormente se utilizó un siRNA específico para disminuir la expresión del gen y evaluar su efecto en la sensibilización de las células de CM al tratamiento quimioterapéutico *in-vitro*. Se determinó la IC50 de la línea celular para el tratamiento con cisplatino y se observó que la viabilidad celular disminuía en las células transfectadas con el siRNA para ABCB10 y tratadas con cisplatino en comparación con aquellas que no fueron transfectadas pero sí tratadas con cisplatino. Estos datos muestran que el crecimiento de las células de CM en condiciones 3D impactan fuertemente el transcriptoma de ARNm y permiten la identificación de potenciales blanco terapéuticos asociados a la resistencia a la terapia.

## 2. ABSTRACT

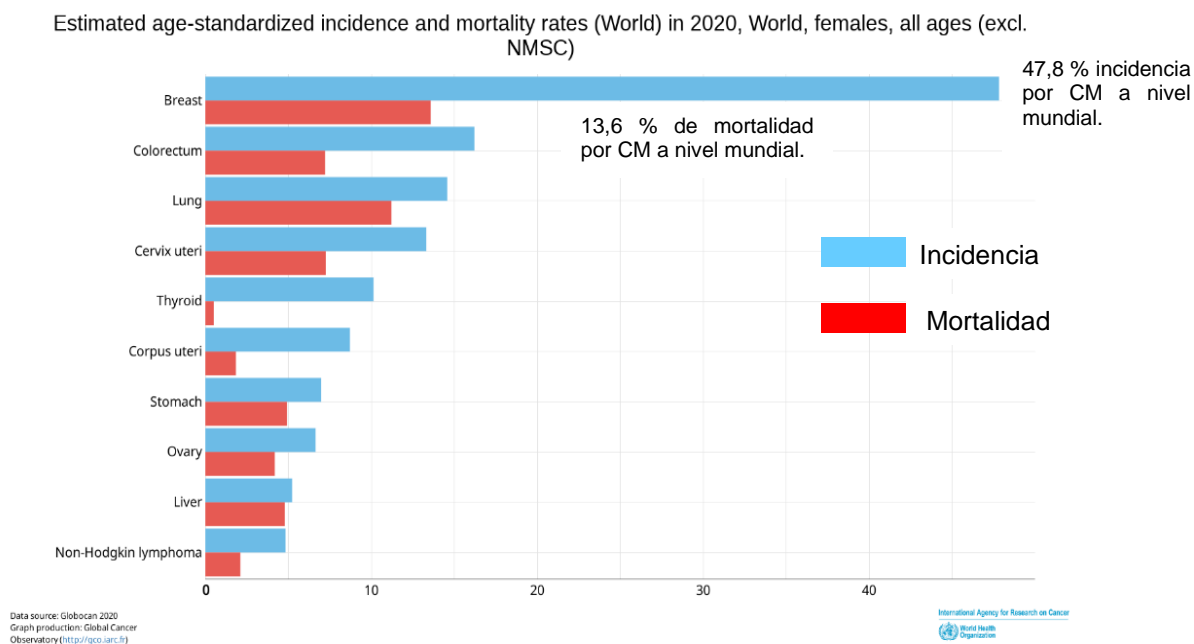
HER2+ malignant breast tumors constitute a type of breast cancer (BC) that is characterized by the amplification of the gene that codes for this protein. HER2 is an oncoprotein that participates in the regulation of cell growth, survival, and differentiation. Although anticancer therapies are targeted depending on the molecular characteristics of the tumor, patients eventually become resistant to treatment (Gottesman M, 2002). Currently, it has been shown that 3D cultures better emulate the characteristics of tumors formed under physiological conditions, which they were used as study model in this project. The aim of this work was to compare differential expression of HER2 BC cell line in two types of culture conditions: a monolayer model and three-dimensional (3D) culture. Our hypothesis is that the latter has a transcriptional profile closer to that of an *in-vivo* tumor and therefore may be expressing genes that confer resistance to pharmacological therapy. First, a microarray assay was performed to evaluate the differential expression of mRNA in both types of culture. The data show that 2870 genes were overexpressed and 1943 down expressed in cells grown in 3D compared to 2D cultures. The bioinformatic analysis identified genes associated with resistance to chemotherapy, which were overexpressed in the 3D condition compared to 2D, highlighting the role of some ABC transporters. Our subsequent analyses identified that ABCB10 transporter as a potential candidate for functional analyses. Primers were designed to validate its expression in 2D and 3D cultures and its overexpression was confirmed in 3D. Subsequently a specific siRNA was used to decrease the expression of the gene and evaluate its effect on the sensitization of BC cells to *in-vitro* chemotherapeutic treatment. The IC<sub>50</sub> of the cell line for treatment with cisplatin was determined and it was observed that cell viability decreased in cells transfected with the siRNA for ABCB10 and treated with cisplatin. These data show that the growth cells of BC in 3D conditions strongly impacts the mRNA transcriptome and allows the identification of potential therapeutic targets associated with therapy resistance.

### 3. INTRODUCCIÓN

Cáncer, es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del lugar de origen o propagarse a otros órganos o tejidos distantes, proceso que se denomina metástasis. (OMS, 2018). Se estima que a nivel mundial 1 de cada 5 personas desarrollarán cáncer durante su vida; y que 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres mueren a causa de esta enfermedad (OMS, 2019). Estas estimaciones actuales sugieren que más de 50 millones de personas viven a los 5 años posteriores a un diagnóstico de cáncer. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer es la primera, o segunda causa principal de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países, y ocupa el tercer o cuarto lugar en otros 23 países (Sung, 2020). Los datos más actuales de esta patología, muestran que, durante el año 2020, a nivel mundial la incidencia del cáncer fue de 19.3 millones de nuevos casos, con una mortalidad calculada en 10 millones (Sung, 2020). Respecto a los índices de mortalidad, el cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer con el 18% del total de muertes; por su parte, el cáncer de mama se ubica en quinto lugar con el 6,9% del total de muertes (Sung, 2020).

El cáncer de mama (CM) es una neoplasia maligna que se origina en el tejido mamario, principalmente en los conductos y en los lobulillos mamarios. Asimismo, el cáncer de mama femenino es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado, representando el 11.7 % del total de casos, seguido muy de cerca por el cáncer de pulmón con el 11.4 % del total de casos. Anatómicamente, la mama está compuesta por dos tipos principales de tejidos, tejidos glandulares y tejidos estromales. Los tejidos glandulares albergan las glándulas productoras de leche, es decir los lóbulos y los conductos lácteos, mientras que los tejidos estromales incluyen tejidos conectivos grasos y fibrosos de la mama. (Sharma *et al.*, 2010). En el año 2020, en todo el mundo se diagnosticó CM a 2.3 millones de mujeres, de éstas 685,000 fallecieron por esa enfermedad. A finales de ese mismo año, 7,8 millones de mujeres a las que en los 5 años anteriores se les había diagnosticado la enfermedad seguían con vida, lo que

hace que este cáncer sea el de mayor prevalencia en el mundo (OMS, 2021). Sin embargo, las tasas de supervivencia del cáncer mamario tienen una enorme variación a nivel mundial, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón; pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos. (Coleman et al., 2008). Aunque se tienen claramente identificados diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama, no es posible identificar factores de riesgo específicos en cada caso de mujer afectada. Los datos más recientes, muestran que a nivel mundial el CM sigue ocupando el primer lugar en incidencia de cáncer con un 47,8% por cada 100,000 habitantes (fig. 1) también respecto a los índices de mortalidad, el cáncer de mama ocupa el primer lugar con el 13.6% de todas las muertes por cáncer en mujeres de todas las edades. (GLOBOCAN, 2022).

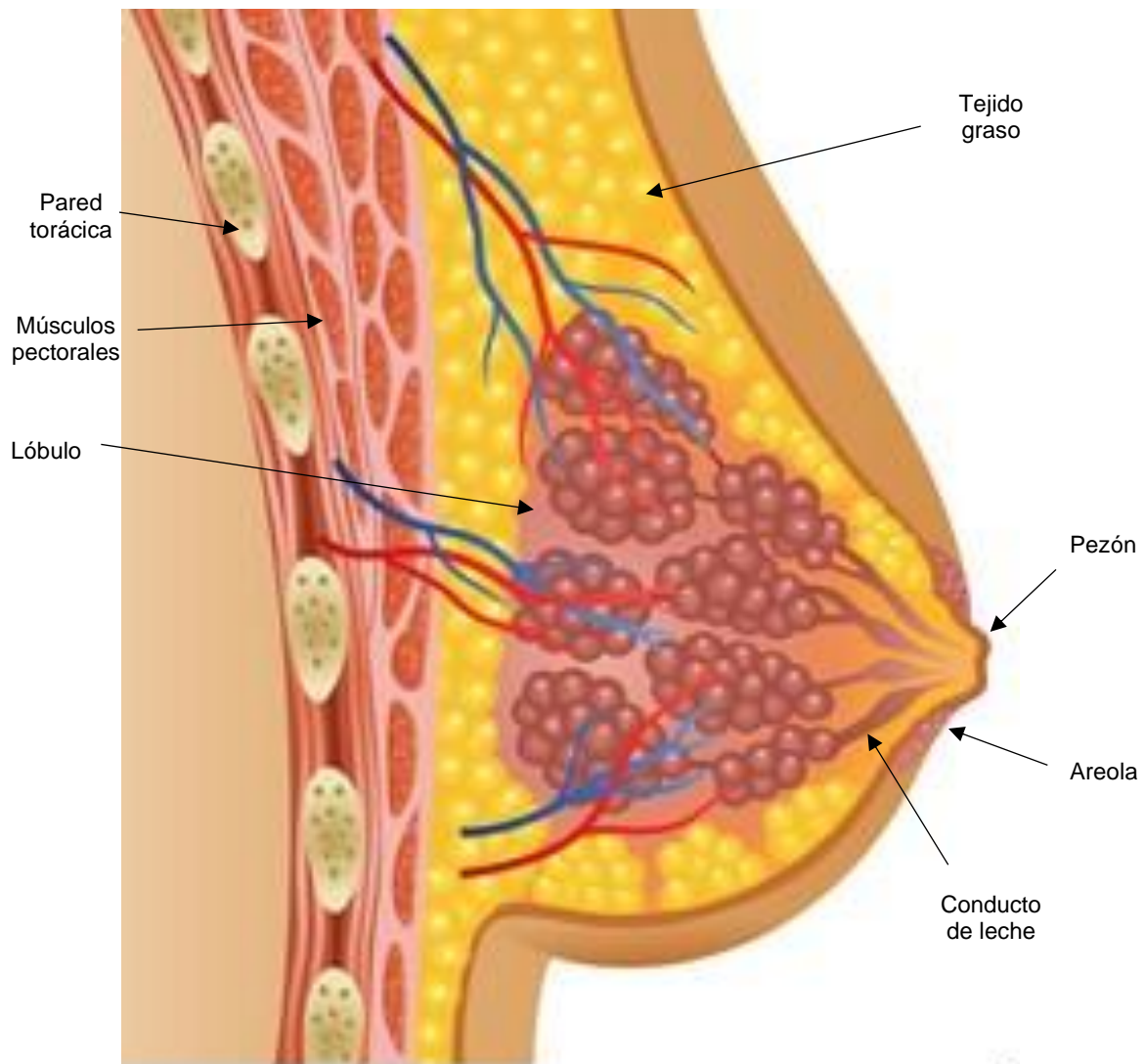


**Fig 1. Tasas de incidencia y mortalidad por tipos de cáncer en mujeres durante el año 2020.**

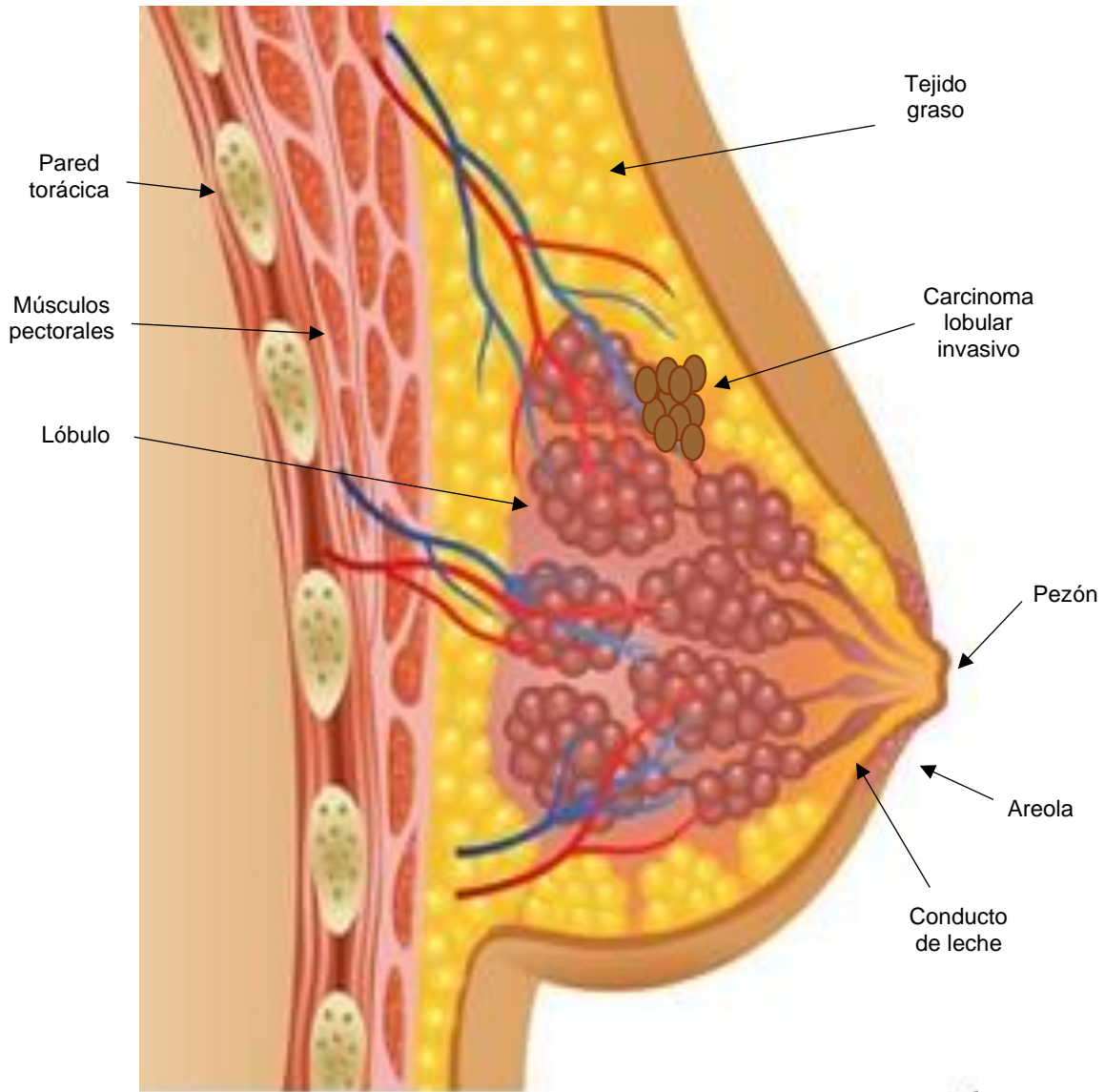
Los datos más recientes, muestran que a nivel mundial el CM sigue ocupando el primer lugar en incidencia de cáncer con un 47,8% por cada 100,000 habitantes, también respecto a los índices de mortalidad, el cáncer de mama ocupa el primer lugar con el 13.6% de todas las muertes por cáncer en mujeres de todas las edades. Tomada y modificada de GLOBOCAN, 2022.

### 3.1 Cáncer de mama

De manera particular, el CM es una neoplasia que se origina en el tejido mamario, principalmente en los conductos y en los lobulillos mamarios (Sharma *et al.*, 2010). La mama está compuesta por dos tipos de tejido, el tejido glandular y tejido estromal o de soporte; el tejido glandular alberga las glándulas que producen la leche, llamados lóbulos, y los ductos por donde pasa la leche. Por su parte, el tejido estromal incluye grasa y tejido conectivo fibroso (fig. 2). Al mismo tiempo, la mama también se compone de tejido inmune linfático que drena fluidos celulares y desechos (Sharma *et al.*, 2010). Hay varios tipos de tumores que pueden desarrollarse en diferentes áreas de la mama, la mayoría de los tumores son el resultado de cambios benignos (no cancerosos) dentro del seno. Existen diferentes tipos de cáncer de mama, que se clasifican de acuerdo al sitio donde se originan 1) Cáncer de mama no invasivo: Es el tipo de cáncer donde las células están confinadas a los ductos y no invaden los tejidos adiposos y circundantes de la mama. El carcinoma ductal in-situ es el más común del cáncer de mama no invasivo (Sharma *et al.*, 2010). 2) Cáncer de mama invasivo: En este tipo de cáncer las células atraviesan el conducto y la pared lobulillar e invaden los tejidos grasos (fig. 3) y conectivos circundantes de la mama, eventualmente este tipo de carcinomas pueden diseminarse a tejidos u órganos distantes (Sharma *et al.*, 2010).



**Fig. 2 Anatomía de la glándula mamaria.** En la figura se pueden observar las estructuras principales de las que se compone. La mama está compuesta por dos tipos de tejido, el tejido glandular y tejido estromal o de soporte; el tejido glandular alberga las glándulas que producen la leche, llamados lóbulos (mostrados en color marrón) y los ductos por donde pasa la leche. Por su parte, el tejido estromal incluye grasa y tejido conectivo fibroso. Imagen tomada y modificada de Rivar, A; Galarza-Paez, L; Peterson, D. 2023.



**Fig. 3. Anatomía de la mama con carcinoma lobular invasivo.** En la imagen se muestra una vista lateral de la mama, se observan las estructuras de las que se compone: como tejido graso, pezón, areola, conducto de leche, lóbulos, músculos pectorales y la pared torácica. En color marrón oscuro se observa un crecimiento anormal de células en los lóbulos, representando un carcinoma lobular invasivo, este tipo de cáncer comienza en las glándulas mamarias (lóbulos) del seno, pero a menudo se disemina invadiendo tejidos grasos y conectivos circundantes, así como otras regiones del cuerpo. Este tipo de carcinoma representa del 10% al 15% de los cánceres de mama. Imagen tomada y modificada de Rivar, A; Galarza-Paez, L; Peterson, D. 2023, con información de Sharma et al., 2010.

### 3.2 Tipos de cáncer de mama más frecuentes.

- Carcinoma lobular in situ (CLIS): El término *in-situ* hace referencia al cáncer que no se ha extendido más allá del área donde inicialmente se desarrolló (fig. 3) (Sharma *et al.*, 2010).
- Carcinoma ductal in situ (DCIS): Es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo, confinado a los ductos de la mama (Sharma *et al.*, 2010).
- Carcinoma lobular invasivo (ILC): Este tipo de cáncer comienza en las glándulas mamarias (lóbulos) del seno (fig. 3), pero a menudo se disemina a otras regiones del cuerpo. ILC representa del 10% al 15% de los cánceres de mama (Sharma *et al.*, 2010).
- Carcinoma ductal invasivo (IDC): Este tipo de cáncer comienza en los conductos lácteos del seno y penetra la pared del conducto, invadiendo el tejido graso de la mama y posiblemente otras regiones del cuerpo. El IDC es el tipo más común de cáncer de mama y representa el 80 % de los diagnósticos de cáncer de mama (Sharma *et al.*, 2010).

Actualmente, se asume que, la diversidad clínica y pronóstica de los diferentes tipos de cáncer de mama que son semejantes y homogéneos en cuanto a sus factores pronósticos clásicos, se establece a nivel molecular al expresar distintos genes que les confieren variabilidad biológica y pronóstica (Perou, 2000). El estudio de esta variabilidad genética ha permitido comprender y predecir el comportamiento biológico del cáncer de mama, y al mismo tiempo ofrecer tratamientos más dirigidos para cada tipo de paciente. El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido clasificar los carcinomas de mama en función de sus características moleculares. De acuerdo con esta clasificación existen 4 subtipos de CM: luminal A, luminal B, HER2 positivo y Basal-like o Triple Negativo (Sorlie, 2003). Los carcinomas de mama tipo luminal son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del receptor de estrógenos (RE), al expresar al RE estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa, pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (Irigoyen, 2011).

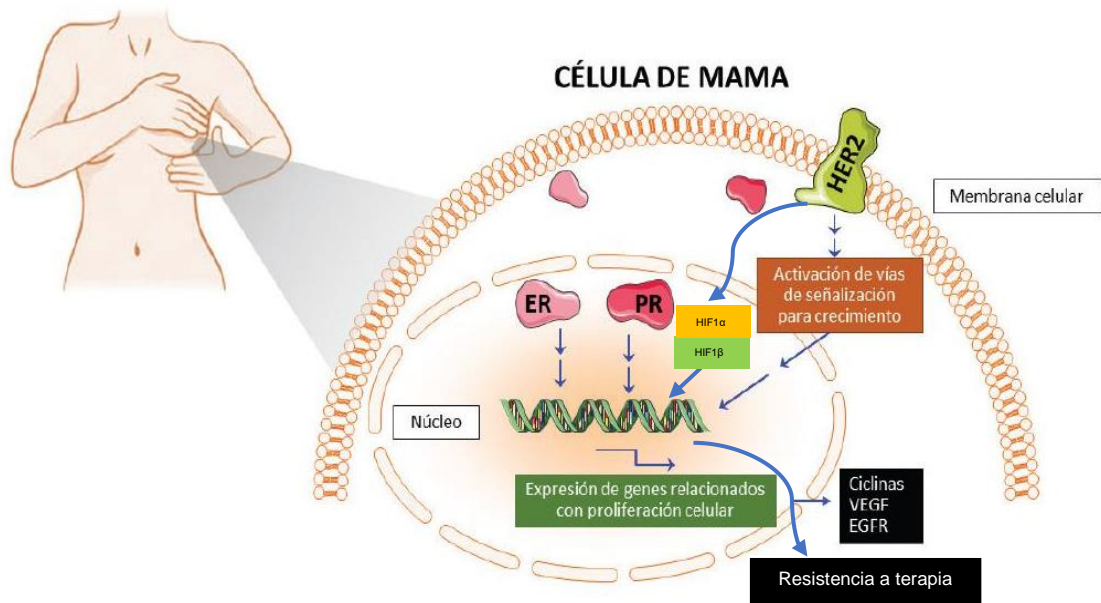
### 3.3 Clasificación molecular del cáncer de mama

Una de las clasificaciones del CM se basa en los patrones moleculares que presentan las células tumorales, de esta manera el CM se clasifica empleando marcadores moleculares, los cuales son proteínas que se encuentran en el núcleo o en la membrana plasmática de las células, se identifican principalmente al receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y la proteína HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), ya que cuando la enfermedad se desarrolla estas proteínas sobrepasan los niveles fisiológicos (Parise, 2014). Estas variaciones en la expresión de genes en diferentes tipos de CM, permiten su clasificación en subtipos moleculares luminal A, luminal B, HER2+ y basal-like o triple negativo (tabla 1).

Clasificación molecular en 4 subtipos de cáncer de mama				
Subtipos	ER	PR	HER2	Distribución de los subtipos
Luminal A	+	+/-	-	38%
Luminal B	+	+/-	+/-	31%
HER2+	+	-	+	16%
TNBC	-	-	-	15%

**Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama (CM).** Una de las clasificaciones del CM se basa en las características moleculares de las células tumorales, se identifican principalmente al receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) y al basal-like o triple negativo (TNBC). Asimismo, se muestra la distribución porcentual que ocupan cada uno de los subtipos en el total de cánceres de mama. Tabla realizada a partir de los datos de Parise, C. & Caggiano, V. 2014.

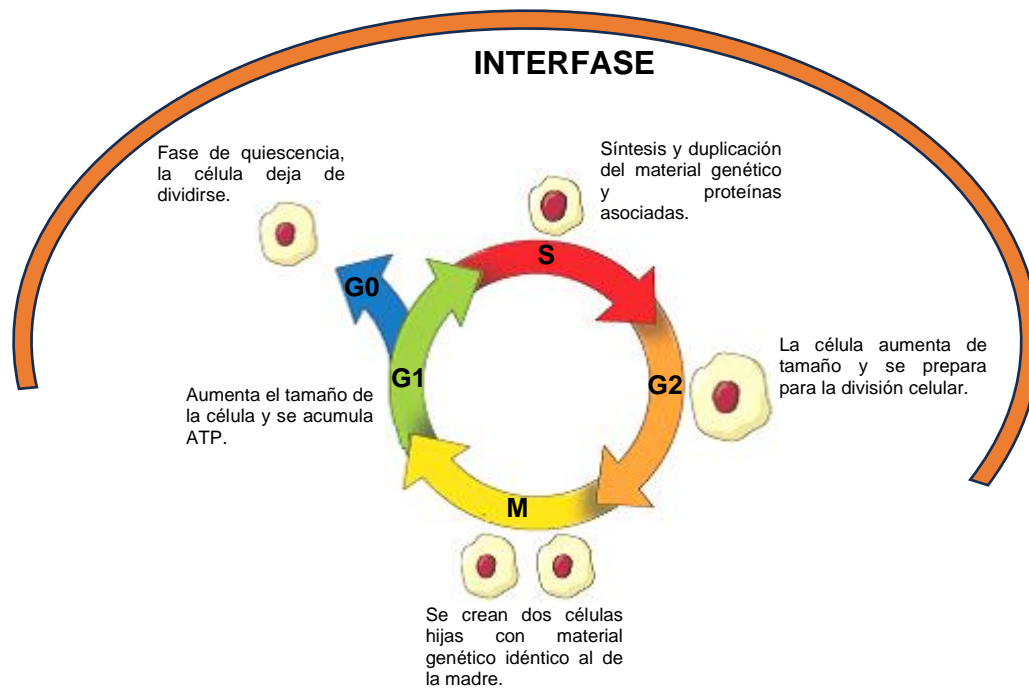
En condiciones normales o fisiológicas el ER se expresa en varios órganos reproductivos femeninos, como el útero, el ovario y la mama (Lee, et al. 2012). Se localiza principalmente en el núcleo y en el citoplasma celular, funciona como un factor de transcripción en respuesta a su unión con la hormona estradiol, propiciando la expresión de sus genes blanco, entre los que se encuentran las ciclinas D, A y E, así como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el PR (Renoir, 2013). La progesterona, por su parte es esencial en el desarrollo mamario durante la pubertad y el embarazo, su unión con el PR conduce a la expresión de genes blanco como C-myc, ciclina D1 y la sintetasa de ácidos grasos (Candanedo-González, 2012). En tejido mamario normal el ER y PR se expresan sólo en una pequeña fracción de las células epiteliales de los ductos y de los lóbulos y su cantidad varía durante el ciclo menstrual y la etapa reproductiva. (Lumachi *et al.*, 2015). En CM, la presencia descontrolada del ER influencia en gran medida la malignidad de la enfermedad, así como la capacidad de metástasis y la respuesta a la terapia endocrina (Lumachi *et al.*, 2015). Debido a que estos tipos de cánceres son más sensibles a terapias hormonales, se les considera de mejor pronóstico (fig. 4).



**Fig. 4. Marcadores moleculares más usados en CM.** Se observa al receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR) los cuales, tras activarse por la unión de su ligando, se traslocan al núcleo funcionando como factores de transcripción de genes relacionados con proliferación celular. También se muestra al receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2) el cual en condiciones hipóxicas o de bajas concentraciones de oxígeno activa río abajo al factor de transcripción HIF1 $\alpha$  el cual se une a HIF1 $\beta$ , traslocándose al núcleo y promoviendo la expresión de genes implicados en la resistencia a terapia. Imagen tomada y modificada de Lumachi *et al.*, 2015

### 3.4 Ciclo celular

Las células cancerosas son muy similares a las células del organismo de las cuales ellas se han originado, asimismo, tienen un material genético (DNA y RNA) similar, pero no idéntico. Esta es la principal razón por la que a menudo no son detectadas por el sistema inmune, en particular cuando este se encuentra debilitado (Cancer info guide, 2009). Las células cancerosas se forman de células normales debido a una modificación o mutación en el material genético, DNA o RNA. Estas modificaciones/mutaciones pueden ocurrir espontáneamente durante el proceso de división celular, conocido como ciclo celular, o pueden ser inducidas por otros factores tales como: radiación nuclear, radiación electromagnética (microondas, rayos X, rayos gamma, rayos ultravioletas, etc), virus, bacterias, hongos y parásitos (debido a la inflamación/ irritación del tejido), radicales libres, evolución y envejecimiento de la célula (Sharma *et al.*, 2010). Todas estas alteraciones, pueden provocar mutaciones en el DNA que podrían dar lugar al inicio de procesos tumorales. El ciclo celular (CC) es la base para la reproducción de los organismos, su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Un ciclo celular típico se da en dos grandes fases; la interfase, que a su vez se divide en: G1, S y G2; y la mitosis que se divide en: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (fig. 5). En la interfase, en G1 se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del DNA nuclear; finalmente en G2 que es el tiempo que transcurre entre la fase S y la mitosis, la célula se prepara para esta última etapa. El ciclo celular culmina con la mitosis donde se divide la cromatina duplicada de modo tal que cada célula hija obtenga una copia del material genético o sea un cromosoma de cada tipo, esta etapa final, da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en una fase denominada G0, la cual corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual pueden permanecer por días, meses y hasta años (Lomanto *et al.*, 2003.).



**Fig. 5. Esquema del ciclo celular (CC) normal.** Este ciclo es la base de la reproducción celular de los organismos, así como la de asegurar que este proceso se realice de forma adecuada y regulada. Un ciclo celular típico se da en dos grandes fases; la interfase, que a su vez se divide en: G1, S y G2; en las cuales primeramente se acumula el ATP necesario para el proceso de división; en la fase S se replica el DNA nuclear y finalmente en G2 la célula aumenta de tamaño y se prepara la mitosis. En esta última etapa la cromatina duplicada en la fase S se divide de modo tal que cada célula hija obtenga una copia del material genético. Esta etapa final da lugar a un nuevo ciclo en G1 o también sucede que algunos tipos de células entren en una fase denominada G0 que es un estado de latencia en la que pueden permanecer por días, semanas, meses y hasta años. Imagen realizada a partir de la información de Lomanto *et al.*, 2003.

Como todo proceso orgánico, el CC esta sujeto a regulación, la cual es realizada en sitios específicos llamados puntos de control, dichos puntos de control pueden frenar o disparar diversos procesos que le permitan a la célula proseguir con su ciclo normal de replicación del material genético, el crecimiento y división (Quezada, 2007). La función de regulación básicamente es realizada por proteínas específicas conocidas como cinasas (CDKs) y ciclinas (ciclinas A o B). Existen además otros factores que controlan el CC, los llamados inhibidores de CDK's (CKI's cyclin-dependent inhibitors) que son proteínas supresoras de tumor que bloquean la actividad de los complejos CDK's/ciclinas y causan arrestos en fases específicas del CC (Quezada, 2007). En las células cancerosas el proceso de división celular esta desregulado, resultando en una proliferación celular descontrolada, causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Existen decenas de formas en que se presenta la enfermedad, pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el CC, y que por lo tanto causa desregulaciones de éste (Quezada, 2007) dando lugar a la formación de células cancerosas.

### 3.5 Perfil transcripcional

Los perfiles de expresión génica son un tema central en la biología molecular, el análisis de los productos transcripcionales producidos por la célula, permiten definir la especificidad celular de ésta. Para comprender el papel que diferentes genes tienen en procesos celulares como la mitosis, la migración, la diferenciación y la apoptosis, se ha hecho uso de diferentes métodos para determinar patrones de expresión de transcripción con un alto grado de sensibilidad y especificidad, convencionalmente hibridación *in-situ* (Smith, 2003). Para obtener datos de expresión génica de todo el genoma, los microarreglos de oligonucleótidos y DNA son particularmente poderosos en el contexto de conocer la secuencia completa del genoma y pueden proporcionar una visión global de los cambios en los patrones de expresión génica en respuesta a alteraciones fisiológicas o manipulación de reguladores transcripcionales (Ewis, et al., 2005). Los microarreglos se utilizan comúnmente para analizar DNA, RNA, proteínas y otros compuestos biológicos (Loewe, 2011). La tecnología de los microarreglos se aplica a múltiples niveles de investigación, y generalmente para comparar la expresión diferencial entre dos condiciones. El análisis de microarreglos es una poderosa herramienta en el área de la genómica funcional, ya que permite la detección simultánea de la expresión de miles de genes en una sola muestra, si bien cada muestra puede considerarse fundamentalmente similar, en realidad contienen variables específicas que deben controlarse y normalizarse para identificar diferencias en los parámetros biológicos (Loewe, 2011). La interpretación precisa de los datos arrojados por un análisis de microarreglos requiere la aplicación de una serie de metodologías bioinformáticas, así como análisis y visualización de datos posteriores, que se pueden estructurar en 1) normalización de datos, 2) análisis estadístico y 3) visualización (Loewe, 2011).

### **3.6 Mecanismos de resistencia a la terapia farmacológica**

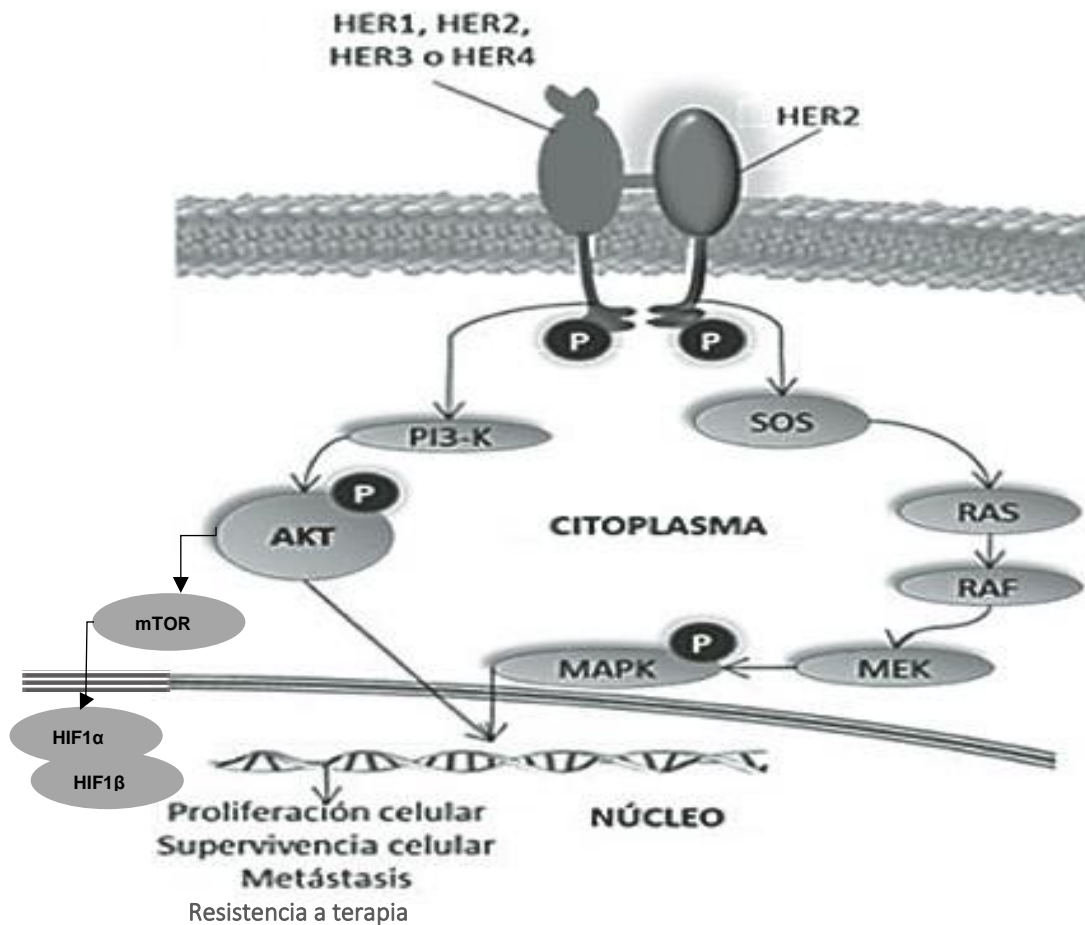
Los tratamientos anticancerígenos se adaptan a las características de los tumores, de esta manera difieren según el subgrupo molecular, de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (Hammond, 2010). La resistencia celular a agentes antimicrobianos o drogas antineoplásicas es la principal razón por la que el tratamiento de enfermedades infecciosas o tumores malignos, puede fallar. Esto debido a que los microorganismos patógenos y/o las células cancerosas han desarrollado varios mecanismos biológicos que les proporcionan una defensa contra el ataque citotóxico por quimioterapéuticos (Lage H, 2003). Una de las razones del fracaso terapéutico puede atribuirse al crecimiento descontrolado de clonas que albergan mecanismos de resistencia específicos que pueden estar presentes incluso antes del inicio del tratamiento. Actualmente se identifican dos tipos de resistencia; la resistencia tumoral intrínseca y la resistencia tumoral adquirida (Roulot, 2016). El tipo de resistencia que el tumor puede adquirir está estrechamente relacionado con la heterogeneidad intra-tumoral y el microambiente. En algunos casos los cambios genéticos conducen a la resistencia al tratamiento, las clonas que tienen la mutación resistente están presentes en una minoría en el tumor inicial y se vuelven dominantes posterior al tratamiento. Es diferente cuando las mismas clonas dominan antes y después del tratamiento, entonces esta clona ha adquirido mutaciones *de novo*, dichas mutaciones específicas le confieren al tumor resistencia a la terapia (Roulot, 2016). El tratamiento del cáncer diseminado se ha vuelto cada vez más dirigido a objetivos moleculares, derivados del estudio de oncogenes y genes supresores de tumores, los cuales están involucrados en el desarrollo de cánceres humanos. Este incremento en la especificidad del tratamiento de cáncer desde el uso general de agentes citotóxicos como el nitrógeno, hasta el uso de anticuerpos monoclonales específicos a inmunotoxinas dirigidos a receptores en la superficie celular y agentes específicos que inactivan cinasas en vías promotoras que promueven el crecimiento celular. Esto ha mejorado las tasas de respuesta y mejorado y reducido los efectos secundarios del tratamiento anticáncer, sin embargo, aún no ha resultado en una cura para la mayoría de los pacientes con cáncer metastásico (Gottesman M, 2002).

Una de las razones por las que el tratamiento anticáncer puede fallar, es debido a factores del huésped como una pobre absorción o un rápido metabolismo o excreción de una droga, dando como resultado niveles séricos bajos, poca tolerancia a los efectos de la droga, incapacidad para entregar la droga al sitio del tumor, como podría ocurrir con tumores grandes o agentes biológicos de alto peso molecular y baja penetración en tejido; tales como anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas (Gottesman M, 2002).

## 4 ANTECEDENTES PARTICULARES

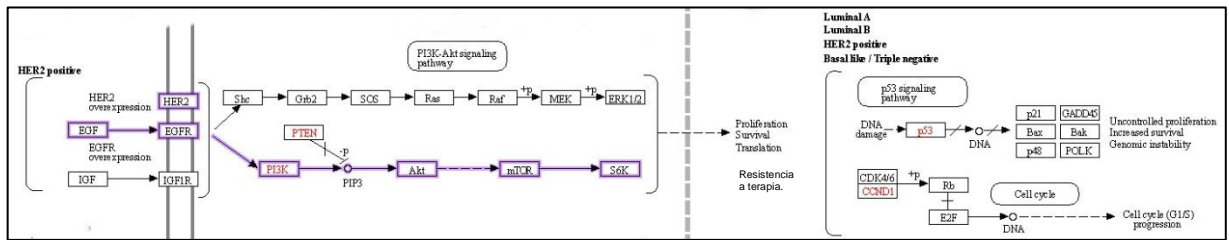
### 4.1 Cáncer de mama HER2+.

De entre los subtipos de CM, el subtipo HER2, está presente en aproximadamente el 20% de todos los cánceres de mama, HER2 es un oncogén y su sobreexpresión, se asocia con un cuadro clínico más severo de la enfermedad, una tasa de recurrencia más alta y una supervivencia más corta (Mitri, 2012). Cerca del 20% de los cánceres de mama están caracterizados por la amplificación de este gen, una célula en condiciones normales tiene dos copias del gen y 50,000 copias de la proteína. Sin embargo, en células cancerígenas con HER2 amplificado hay más de dos copias del gen y aproximadamente 1,000,000 de copias de la proteína (Gutiérrez, 2011). HER2 es una proteína que pertenece a una familia de receptores formada por 4 miembros ErbB-1/Her1, ErbB-2/Her2 (neu), ErbB-3/Her3 y ErbB4/Her4, los receptores de la familia ErbB/HER pertenecen a la subclase 1 de la súper familia de receptores tirosina cinasa (RTK's), la actividad de estos receptores se centra en la mediación y regulación de señales del medio externo hacia el interior de las células, los receptores son activados al unirse a su ligando natural, la activación de estos receptores promueve la activación de señales río abajo que promueven una alta proliferación celular (Zerecero et al., 2012.), (fig. 6). La homo o heterodimerización de HER2 con otros miembros de esta familia (fig. 6) da como resultado una autofosforilación de los residuos de tirosina dentro del dominio citoplasmático, iniciando una variedad de vías de señalización, principalmente la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 1-4,5-bifosfato3-cinasa (PI3K) y proteína cinasa C (PKC), lo que resulta en proliferación, supervivencia, diferenciación, angiogénesis e invasión celular (Lqbal, 2014). En cuanto al papel del receptor HER2 en el cáncer de mama, se ha demostrado que éste está presente aproximadamente en el 20 a 30% de todos los tumores de cáncer de mama, y que su sobreexpresión, se asocia con un cuadro clínico más severo de la enfermedad, una tasa de recurrencia más alta y una supervivencia más corta (Mitri, 2012).



**Fig. 6. Vías de activación mediadas por miembros de la familia HER.** HER2 es una proteína que pertenece a una familia de receptores formada por 4 miembros ErbB-1/Her1, ErbB-2/Her2 (neu), ErbB-3/Her3 y ErbB4/Her4, los receptores de la familia ErbB/HER pertenecen a la subclase 1 de la súper familia de receptores tirosina cinasa (RTK's), la actividad de estos receptores se centra en la mediación y regulación de señales del medio externo hacia el interior de las células, De manera particular, la homo o heterodimerización de HER2 con otros miembros de esta familia da como resultado una autofosforilación de los residuos de tirosina dentro del dominio citoplasmático, iniciando una variedad de vías de señalización, principalmente la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 1-4,5-bisfosfato3-cinasa (PI3K) lo que resulta en proliferación, supervivencia, diferenciación, angiogénesis, invasión celular así como resistencia a terapia. Imagen tomada y modificada de Colonia *et al.*, 2015 con información de Lqbal, 2014; Rueff & Rodrigues, 2016 y Zerecero *et al.*, 2012.

Ya se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína HER2 activa constitutivamente la vía PI3K/AKT/mTOR (Burrell *et al.*, 2010), la activación de este eje de señalización promueve la supervivencia y proliferación de células aneuploides en cultivo (fig 7). El supresor de tumores PTEN antagoniza la actividad de PI3K y, al igual que la sobreexpresión de HER2, la pérdida de PTEN da como resultado la activación constitutiva de AKT. La pérdida de PTEN es común en tumores humanos aneuploides (Burrell *et al.*, 2010).



**Fig. 7. Vía PI3K/AKT/mTOR activada por HER2.** La sobreexpresión de la proteína HER2 mantiene constitutivamente activa la ruta PI3K/AKT/mTOR, promoviendo una alta proliferación y supervivencia celular. En la imagen se observa al supresor de tumores PTEN el cual antagoniza la actividad de PI3K y, al igual que la sobreexpresión de HER2, la pérdida de PTEN da como resultado la activación constitutiva de AKT, la cual es común en tumores aneuploides. Imagen tomada y modificada de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway Database, 2023) con información de Burrell *et al.*, 2010.

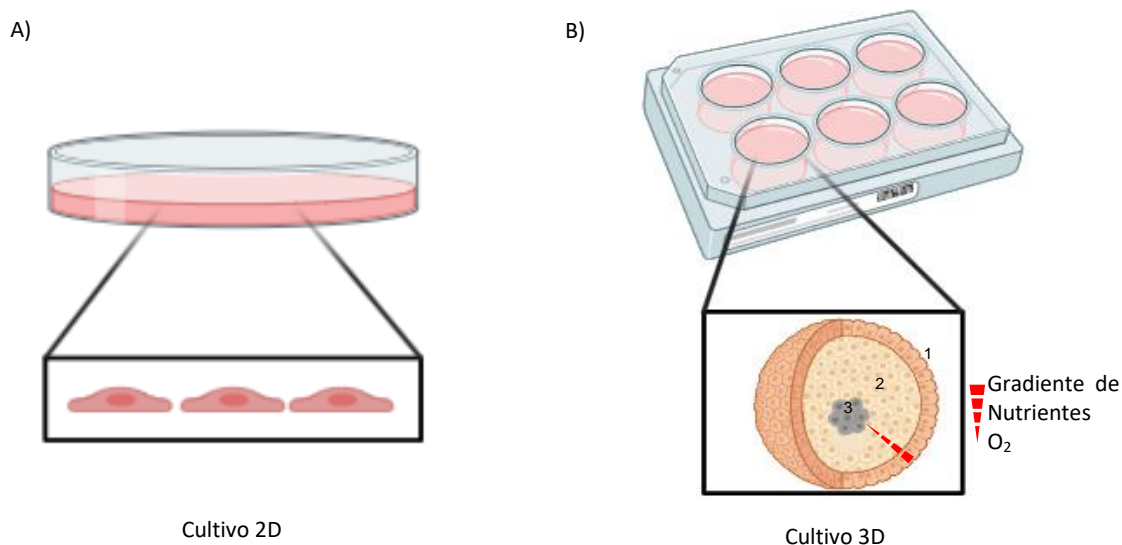
A pesar de las terapias endocrinas y dirigidas contra HER2, para estos tumores en modelos pre-clínicos y bidimensionales, la respuesta clínica de estos tratamientos puede variar mucho con la resistencia terapéutica como un factor limitante. (Gangadhara, 2016). Los tumores resistentes presentan frecuentemente metástasis con mal pronóstico asociado, lo que resalta la necesidad de tratamientos más efectivos en las primeras fases de la enfermedad (Gangadhara, 2016). La creciente evidencia apunta ahora a la interacción entre el tumor y su microambiente circundante como un factor determinante de la respuesta terapéutica y la sensibilidad (Hu, 2008).

La influencia del estroma en la respuesta terapéutica a los medicamentos citotóxicos ha sido investigada a través de estudios en ambientes 3D ricos en matriz, donde las células tumorales crecen de tal manera que muestran resistencia a la Doxorubicina en comparación con las respuestas en cultivo 2D tradicional (Li, 2010). Las interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular pueden atenuar la respuesta al fármaco a través de alteraciones en las vías de señalización internas, posiblemente como resultado de la activación de integrinas. Por ejemplo, la activación de la integrina  $\beta$ -1 inducida por la matriz, da como resultado la supresión de la apoptosis inducida por la quimioterapia, mayor capacidad tumoral y promueve la resistencia al cisplatino (Sethi, et al. 1999). Estudios clínicos importantes han mostrado que la composición de la MEC del tumor se correlaciona con la pérdida de la respuesta clínica a la quimioterapia, así como la disminución de la supervivencia general (Bergamaschi, et al. 2008). Por lo tanto, una mejor comprensión de la manera en la que el tumor interactúa con su microambiente, es una pieza clave para el desarrollo de estrategias clínicas de tratamiento más efectivas. Durante las décadas anteriores se ha evaluado y demostrado que las señales de la MEC juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de la especificidad tisular de las células mamarias no malignas, estos estudios se han extendido a células mamarias humanas malignas y en 1992 se mostró que las células no malignas y malignas se pueden distinguir de manera rápida y confiable cuando se cultivan en cultivos tridimensionales (3D) de MEC rica en laminina (IrECM) (Petersen et al., 1992). Una de las limitantes actuales para tener una mejor comprensión de la biología del cáncer, así como la de enfoques innovadores para el tratamiento de esta enfermedad, se debe a la falta de mejores modelos preclínicos de tumores que aborden de manera más detallada la heterogeneidad tumoral, así como las diferencias que existen en los tumores entre diferentes pacientes, las respuestas terapéuticas e incluso la toxicidad al tratamiento.

## **4.2 Cultivos bidimensionales (2D) vs cultivos tridimensionales (3D).**

Los cultivos celulares permiten comprender la biología celular, la morfología de tejidos, los mecanismos de algunas patologías, la acción de drogas, la producción de proteínas y el desarrollo y la producción de tejidos. Los cultivos celulares son a menudo utilizados en la investigación preclínica de algunas drogas, en la investigación en cáncer y en el estudio de la función de genes (Kapałczyńska *et al.*, 2018). En la actualidad los cultivos en 2D adherentes son ampliamente usados en diversas áreas de investigación científica, en este tipo de cultivos las células crecen en monocapa en una caja de cultivo o en una placa de Petri. Sin embargo, en ambos tipos de cultivos, las células crecen con una de sus caras unidas a una superficie de plástico (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Esta última característica es una de sus más grandes desventajas, puesto que las interacciones célula-célula y célula-entorno extracelular no se dan como lo harían en un tumor. Cabe resaltar que esas interacciones son responsables de la comunicación entre células adyacentes, y les permiten llevar a cabo procesos de diferenciación celular, proliferación, vitalidad, así como una expresión diferenciada de genes y proteínas (fig. 2). Por una parte, debido al aislamiento de la muestra en un cultivo en 2D la morfología de las células se altera, dicha alteración puede afectar su función impactando en la organización de las estructuras intracelulares, así como la secreción y la señalización de ésta. Por otra parte, al crecer en monocapa, las células se ven limitadas al acceso de los nutrientes que existen en el medio, así como al oxígeno, los metabolitos y moléculas de señalización o ligandos (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Ahora bien, respecto a los cultivos tridimensionales (3D), éstos basan su teoría en las interacciones que deben existir entre célula-célula y célula-matriz extra celular (MEC), las cuales están presentes en el micro ambiente tumoral. Existen diferentes metodologías que se pueden utilizar al momento de hacer cultivos en 3D, entre estas, resaltan: 1) Cultivos en suspensión en placas no adherentes, 2) Cultivos en medio concentrado o en sustancias gelatinosas y 3) Cultivos en andamio. De manera general, el concepto de esferas en 3D se basa en la creación de estructuras esferoideas tipo organoide, en las que las células se agregan en varias capas, de esta manera se imitan las características físicas y bioquímicas de una masa tumoral sólida en condiciones patológicas dentro de un organismo. Estos esferoides se van formando a partir de una sola célula en el epicentro, a medida que las células se multiplican empujan a las

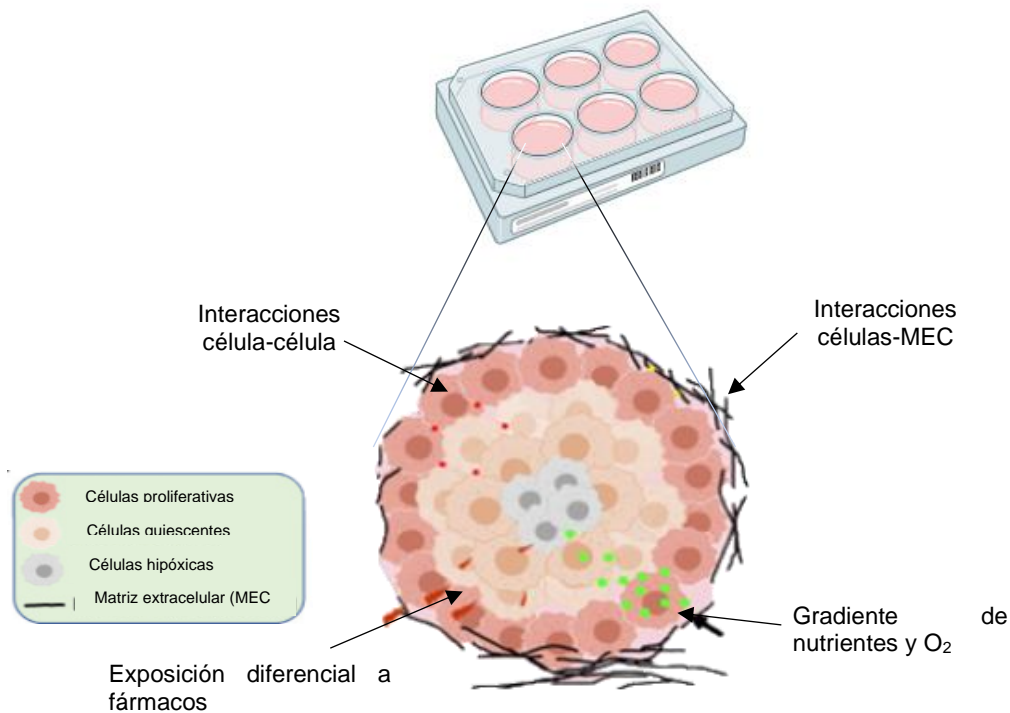
células nuevas hacia afuera (Dutta, 2018). Este tipo de cultivo se prefiere para probar candidatos a fármacos antitumorales y anticancerígenos. No solo por su semejanza con la morfología del tumor, sino también por la mayor precisión que puede ofrecer con los ensayos de sensibilidad a fármacos. Para los cultivos en 3D, se usan normalmente hidrogeles que están compuestos de polímeros hidrófilos que se hinchan al absorber agua. La incorporación de agua da como resultado la generación de bolsas hidrófilas y lipófilas. Estos hidrogeles pueden imitar las propiedades físicas, químicas, eléctricas y biológicas de la mayoría de los tejidos biológicos. Ya que poseen una red polimérica tridimensional (3D) altamente hidratada y pueden resistir hasta 20 a 40 veces más agua en comparación con su peso seco (fig. 2) (Dutta, 2018).



**Fig. 8 Modelos 2D y 3D de cultivo celular mamario.** En la figura se muestran células cultivadas en 2 tipos de condiciones, un modelo tradicional en monocapa 2D (A) y un cultivo 3D (B). En el cultivo 2D las células crecen juntas formando una monocapa con una de sus caras unidas a una superficie plástica lo que limita la interacción entre estas alterando su morfología, este tipo de modelo no proporciona un sistema eficaz para capturar la intrincada relación entre las células epiteliales en la mama. Por el contrario, en el cultivo 3D se promueve la interacción que debe existir entre células y células-matriz extracelular (MEC), al mismo tiempo la formación de esferoides en estos cultivos crea un gradiente de oxígeno y nutrientes al interior de estos, provocando que las células más externas sean 1) células con alta proliferación, 2) células quiescentes y 3) células hipoxicas y/o necróticas. Imagen elaborada a partir de la información de Strnadel, *et al.*, 2018 y Kapałczyńska *et al.*, 2018.

### 4.3 Cultivos en 3D.

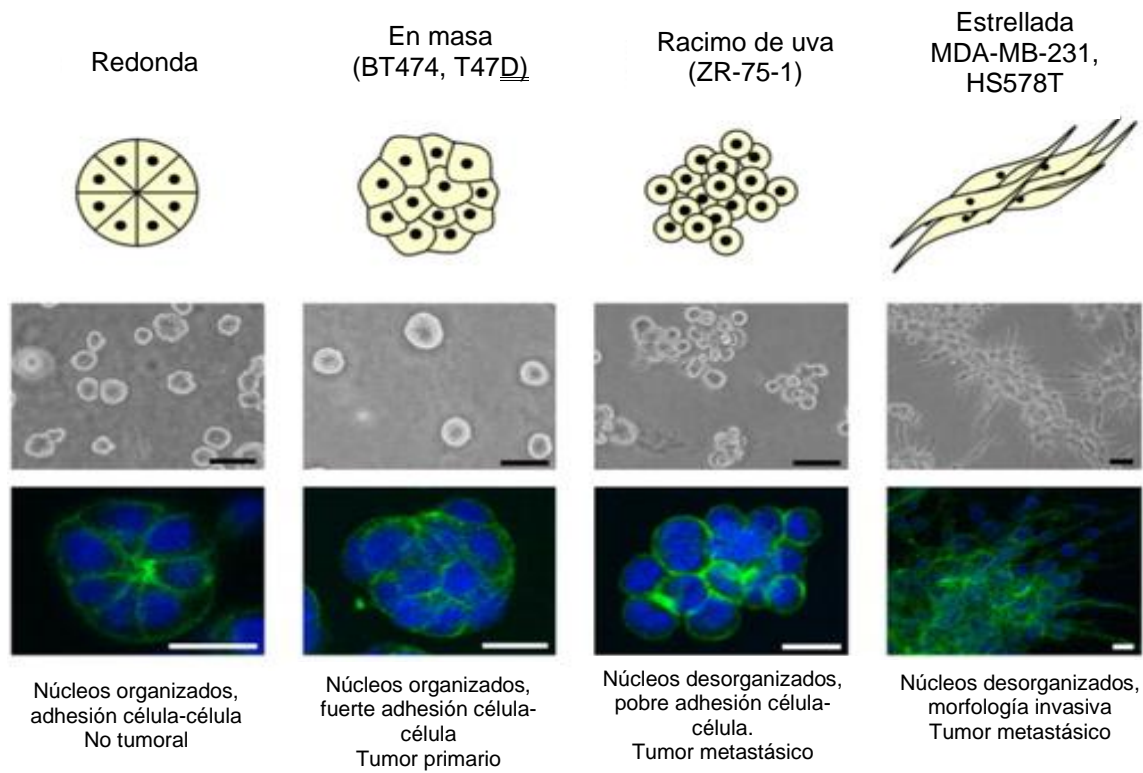
Muchas de las investigaciones en torno a la enfermedad han sido realizada en ensayos *in-vitro* que utilizan células cancerosas cultivadas en monocapa o cultivos bidimensionales, dichos modelos están muy lejos de imitar la heterogeneidad de los tumores humanos ya que las células crecen adheridas a una superficie plástica que limita la interacción entre ellas, provocando una pérdida de la polaridad, morfología alterada y una pobre interacción entre ellas, por lo tanto se necesitan nuevos modelos preclínicos para innovar en la investigación traslacional en cáncer. Por lo tanto, actualmente se están utilizando esferoides tridimensionales (3D) que son un tipo de cultivos de células autoorganizadas cultivadas en sistemas de cultivo en 3D que imitan los tejidos originales de los que se originan las células primarias. Los esferoides 3D ofrecen una visión más profunda de los procesos celulares cruciales en la formación de tejidos y órganos, así como los procesos patológicos (Dzobo, *et al.* 2018). 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). Los cultivos 3D que pueden reflejar el entorno *in-vivo* se consideran un método eficaz para la investigación del cáncer y los estudios toxicológicos (Ramaiahgari, 2014). Hay estudios que indican diferentes respuestas celulares para la toxicidad de los medicamentos entre las condiciones de cultivo en 2D vs 3D (Mueller, *et al.* 2014). Los esferoides 3D se componen de células organizadas de manera tal que imitan las condiciones que podrían presentar células de un tumor *in-vivo*, (fig. 9) en este tipo de cultivos se usan hidrogeles que funcionan como andamios 3D, a su vez estos funcionan como una MEC; uno de estos es la matrigel, esta matriz influye tanto en la composición celular, como en las características moleculares del esferoide (Dzobo, *et al.* 2018).



**Fig. 9. Estructura de un esferoide multicelular.** Los cultivos 3D que pueden reflejar el entorno *in-vivo* se consideran un método eficaz para la investigación del cáncer y los estudios toxicológicos, que indican diferentes respuestas celulares para la toxicidad de los medicamentos entre las condiciones de cultivo en 2D vs 3D. Los esferoides 3D se componen de células organizadas de manera tal que imitan las condiciones que podrían presentar células de un tumor *in-vivo*, en este tipo de cultivos se usan hidrogeles que funcionan como andamios 3D, a su vez estos funcionan como una MEC; uno de estos es la matrigel, esta matriz influye tanto en la composición celular, como en las características moleculares del esferoide. En estos esferoides se identifican 3 zonas; una con células en proliferación (la capa más externa), otra con células quiescentes o en reposo (zona media) y más hacia el centro una zona de células hipóxicas o necróticas. Imagen tomada y modificada de: Salinas-Vera, *et al.* 2022.

#### **4.4 Morfología de los cultivos en 3D**

Existen cuatro clases morfológicas distintas (redonda, en masa, en racimo de uva y estrellada) que muestran correlaciones con los patrones de expresión de genes y proteínas subyacentes (fig 10). La clase de células redondas incluye a las líneas 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 de tipo masa formada por las líneas celulares BT-474, MCF-7 y T47D, también forman colonias, pero poseen núcleos desorganizados. La clase tipo racimo de uva, que abarca las líneas celulares SK-BR3, ZR-75-1 y ZR-75 forman colonias con pobres contactos célula-célula y se distinguen por su apariencia en racimo de uva. Por último, la clase de forma estrellada, formada por las líneas celulares BT-549, HS-578T, MDA-MB-231 y MDA-MB-436 se distinguen por su fenotipo invasivo en cultivo 3D, con proyecciones estrelladas que a menudo unen múltiples colonias celulares. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la línea celular BT-474 debido a su capacidad de promover la resistencia al tratamiento farmacológico (Kenny *et al.*, 2007).

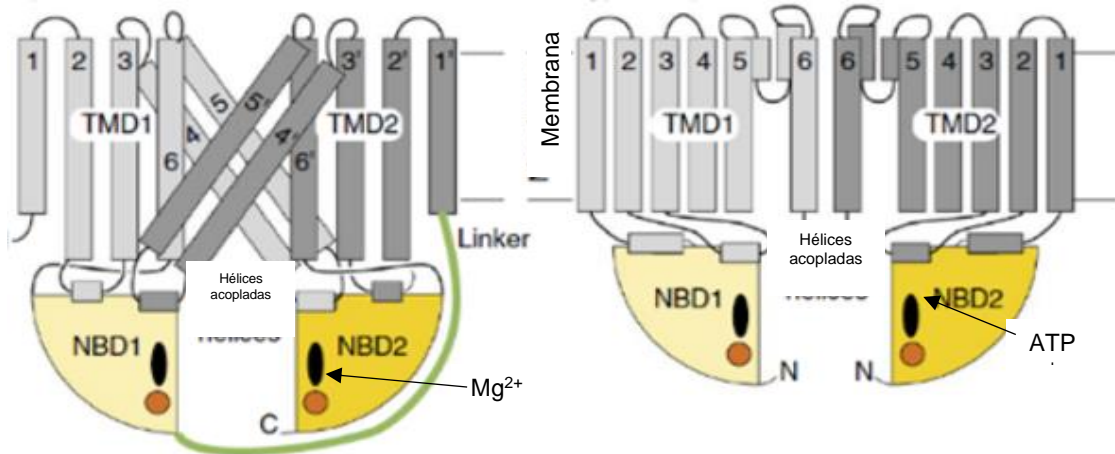


**Fig. 10. Clasificación morfológica de líneas celulares de mama cultivadas en 3D.** Existen cuatro clases morfológicas distintas, de esta manera tenemos a la redonda, en masa, en racimo de uva y estrellada que muestran correlaciones con los patrones de expresión de genes y proteínas subyacentes. Imagen tomada y modificada de Kenny *et al.*, 2007.

#### **4.5 Resistencia a terapia mediada por transportadores.**

Las tasas de entrada o salida anormal de medicamentos a la célula cancerosa, así como su biotransformación anormal en metabolitos inactivos se encuentran entre los principales mecanismos mediadores que conducen a la resistencia mediada por la farmacocinética. Ya se sabe que los transportadores de eflujo multifuncionales de la familia de genes ABC desempeñan un papel importante en la resistencia a múltiples drogas (MDR) de las células tumorales, lo que les confiere resistencia a varios fármacos contra el cáncer. El genoma humano codifica 48 transportadores ABC organizados en siete subfamilias distintas (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF Y ABCG) y al menos 15 de estos miembros están asociados con MDR (Rueff & Rodrigues, 2016). Los transportadores ABC son una super familia de proteínas eucariotas y procariotas involucradas en el movimiento vectorial impulsado por ATP de un solo sustrato o de un grupo de sustratos relacionados, tales como iones, azúcares, aminoácidos, oligosacáridos, péptidos, proteínas (Wandersman, 1998), fosfolípidos, esteroides, sales biliares y fármacos anfipáticos (Rueff & Rodrigues, 2016). Estos transportadores son caracterizados por la presencia de un dominio de unión a nucleótido (NBD) con motivos conservados que unen e hidrolizan ATP, la mayoría de las proteínas ABC son principalmente transportadores que importan sustratos para el consumo de nutrientes a través de membranas biológicas o para exportar moléculas del citosol al espacio extracelular. Los transportadores ABC eucarióticos son generalmente (pseudo) estructuras simétricas de dos pliegues con dos dominios transmembrana entrelazados (TMD) conectados a dos NBD, cada TMD entra en contacto con ambos NBD, y los NBD se dimerizan formando dos sitios de unión a ATP en su interfaz. Las cavidades TMD transitorias a lo largo del eje de simetría perpendicular al plano de la membrana participan en la translocación del sustrato (fig. 11) (Srikant, & Gaudet, 2019). ABCB10 (también conocido como ABC mitocondrial eritroide, ABCme, mABC2 o ABCBA) es uno de los tres transportadores ABC que se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias humanas, con los NBD dentro de la matriz mitocondrial (Shirihai, et al. 2000). Las mitocondrias sintetizan ATP, un proceso que produce especies reactivas de oxígeno tóxicas, que dañan el ADN mitocondrial; también son el sitio de síntesis de metabolitos, como el hemo y los lípidos. La expresión de ABCB10 se induce durante la diferenciación eritroide y la

sobreexpresión aumenta la síntesis de hemoglobina. Sin embargo, ABCB10 también se expresa en muchos tejidos no eritroides, lo que sugiere funciones adicionales no relacionadas con la síntesis de hemoglobina (Shirihai, et al. 2000).



**Fig. 11 Estructuras esquemáticas de los transportadores tipo ABC.** Se muestran las estructuras de los transportadores tipo I (ABCB, ABCC y ABCD; izquierda) y tipo II (ABCA y ABCG; derecha). Los transportadores tipo ABC eucarióticos son generalmente (pseudo) estructuras simétricas de dos pliegues con dos dominios transmembrana entrelazados (TMD) conectados a dos dominios de unión a nucleótido (NBD) cada TMD entra en contacto con ambos NBD, y los NBD se dimerizan formando dos sitios de unión a ATP en su interfaz. En la imagen los TMD pseudosimétricos se muestran en color gris claro y oscuro cada uno acoplado a un NBD amarillo claro y oscuro donde se une Mg<sup>2+</sup> y ATP representados con círculos anaranjado y negro. Imagen tomada y modificada de: Srikant & Gaudet, 2019.

## **5. HIPÓTESIS**

Si el crecimiento de las células tumorales en cultivos organotípicos impacta la organización tridimensional del genoma, entonces se espera encontrar cambios en la expresión global de genes, incluyendo genes asociados con la respuesta a la terapia farmacológica.

## **6. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial, la alta prevalencia de esta enfermedad la sigue colocando como la primera causa de diagnóstico por cáncer en las mujeres. Se ha demostrado que las células que presentan en su membrana el receptor HER2+ tienen una alta capacidad proliferativa y de diferenciación celular. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en cultivos bidimensionales en monocapa los cuales no reflejan del todo el microambiente tumoral.

En este estudio proponemos que el uso de cultivos en 3D tipo organoides podría imitar de mejor manera las características ambientales que ocurren en los tumores *in-vivo*, lo cual nos permitirá evaluar de mejor manera el efecto que tienen los cultivos 3D en la expresión génica a nivel de RNAm y en la respuesta a la terapia farmacológica.

## 7. OBJETIVOS

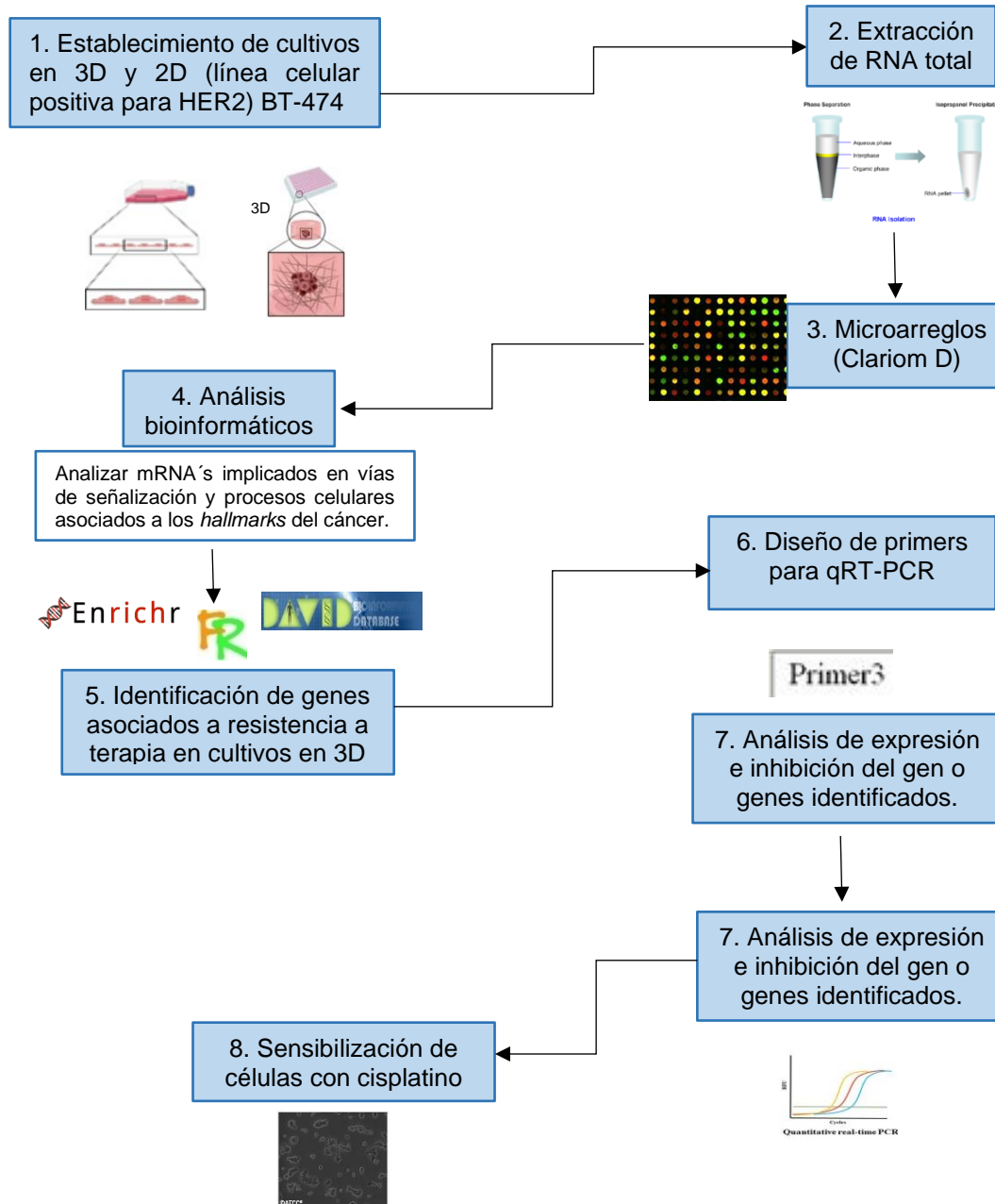
### 7.1 General.

Evaluar el efecto de los cultivos en tres dimensiones (3D) organotípicos en la expresión global de genes a nivel transcripcional (RNAm) y en la respuesta a la terapia farmacológica en células de cáncer de mama HER2+.

### 7.2 Particulares

1. Establecer el cultivo en tres dimensiones (3D) de células de cáncer de mama HER2+ y realizar un análisis morfológico y estructural de los esferoides.
2. Determinar los cambios en la expresión global de genes a nivel de RNAm (transcriptoma) en las células de cáncer de mama HER2+ crecidas en 3D en comparación con los cultivos en monocapas en 2D.
3. Realizar un análisis bioinformático de los genes expresados diferencialmente e identificar las rutas de señalización y procesos celulares asociados a los *hallmarks* del cáncer e identificar aquellos genes asociados a resistencia a terapia, que se hayan sobreexpresado en la condición 3D.
4. Inhibir la expresión de un gen asociado a resistencia a terapia tipo ABC y sensibilizar *in-vitro* el cultivo celular con tratamiento farmacológico.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1 Cultivos de células en 2D y en 3D.**

Se establecieron los cultivos tridimensionales de la línea celular BT-474 en medio Hybri-Care y 10% de suero fetal bovino (SFB). Para la generación de los organoides 3D, las células del cultivo 2D de BT-474 fueron cultivadas en placas de adherencia ultrabaja y se diluyeron en 50 uL de Matrigel al 50% y posteriormente se colocaron 50 uL de medio organoide (Hybri-Care, suplementado con 1X B27, 20 ng / mL EGF y 20 ng / mL FGF) al día siguiente y cada tres días, los cultivos 3D recibieron 50 ul de medio completo fresco. Los organoides se controlaron durante 8 días mediante microscopía a 40X y microscopía electrónica.

### **9.2 Extracción de RNA total**

El RNA total, fue aislado a partir de células en monocapa y esferoides de seis días de cultivo utilizando el método de columnas de separación PARISTM Kit (#AM1921, Applied Biosystems, Woburn, MA, USA) que excluye el RNA menor a 200 pb. La concentración del RNA fue determinada usando NanoDrop 1000 (Spectrophotometer, Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA). Las muestras de ARN total de alta calidad deben tener una relación A260 / A280 de 1.8 a 2.0, lo que indica la ausencia de proteínas contaminantes. La efectiva eliminación del RNA ribosomal se corroboró por electroforesis capilar en el bionalizador Agilent 2100. Posteriormente, se evaluó la integridad de la muestra de RNA, la cual se llevo a cabo mediante el análisis de microfluidos, utilizando el instrumento Agilent <sup>TM</sup> 2100 Bioanalyzer <sup>TM</sup> con un kit RNA LabChip®, este análisis utiliza el número de integridad del ARN (RIN) para evaluar la integridad del ARN. El software bioanalyzer muestra resultados como la concentración de la muestra y la denominada relación ribosómica 28s y 18s.

### 9.3 Ensayo de microarreglos.

Para llevar a cabo el ensayo de microarreglos primeramente se verifico la calidad y la integridad de las muestras de RNA, mediante electroforesis en chip con Agilent 2100 bionalyzer, se realizo una RT y se añadieron *primers* con una secuencia promotora (T7) en el extremo 5' y se sintetizo la 1ª cadena de cDNA utilizando un master mix en un tubo libre de nucleasas. Posteriormente, se sintetizo la segunda cadena de cDNA, en este paso la cadena sencilla de cDNA es convertida en cDNA de doble cadena, la cual actúa como un templado para la transcripción in-vitro. (La reacción utiliza DNA polimerasa y RNasa H de manera simultánea para degradar el RNA y sintetizar la segunda cadena de cDNA). Después, se sintetizo el cRNA mediante transcripción in-vitro, en este procedimiento el RNA complementario es sintetizado y amplificado mediante RT-in-vitro (IVT) usando como templado la segunda cadena de cDNA y T7 RNA polimerasa. Posteriormente se sintetizo en un segundo ciclo la primera cadena de cDNA, mediante transcripción reversa de cRNA, usando un segundo ciclo de primers. Esta cadena de cDNA contiene dUTP's (uridina 5 trifosfato) en proporción fija con respecto a dTTP (en este paso se tiene que hidrolizar el RNA usando RNasa H, y se purifica la cadena de cDNA de segundo ciclo para eliminar enzimas, sales y dNTP no incorporados, este paso prepara el cDNA para la fragmentación y el etiquetado). Ahora, se fragmenta y se marca la cadena de cDNA usando Uracilo-DNA-glicosilasa (UDG) y endonucleasa 1 apurinica/apirimidinica (APE1). Por último, se preparó el master mix de hibridación en un tubo libre de nucleasas, con todos los fragmentos marcados, se vortexeo y se centrifugo para recuperar el sedimento, y combinarlo con el coctel de hibridación, que contiene el master mix y el cDNA fragmentado y marcado con biotina. De esta manera, se escaneo el microarreglo y se cuantifico la señal.

#### **9.4 Análisis bioinformático de los genes modulados.**

Para el análisis de expresión diferencial utilizamos softwares de acceso libre como GSEA y FunRich, y plataformas como DAVID, Enrichr y WikiPathways. El mapa de expresión diferencial fue generado utilizando el software de programación R. Posteriormente los RNAm identificados con una sobreexpresión y subexpresión en función de su valor de Fold Change, se analizaron con la base de datos Enrichr, la cual nos permitió identificar que rutas de señalización estaban enriquecidas en nuestros resultados de microarreglos. Asimismo, si esos transcritos estaban implicados en algún *hallmark* del cáncer; se buscó si había genes involucrados en la resistencia a terapia, para esto se utilizó la plataformas GSEA, la cual cuenta con un conjunto de genes anotados que están involucrados en diferentes *hallmarks* del cáncer, entre ellos la resistencia a la terapia.

#### **9.5 Análisis de expresión del gen ABCB10.**

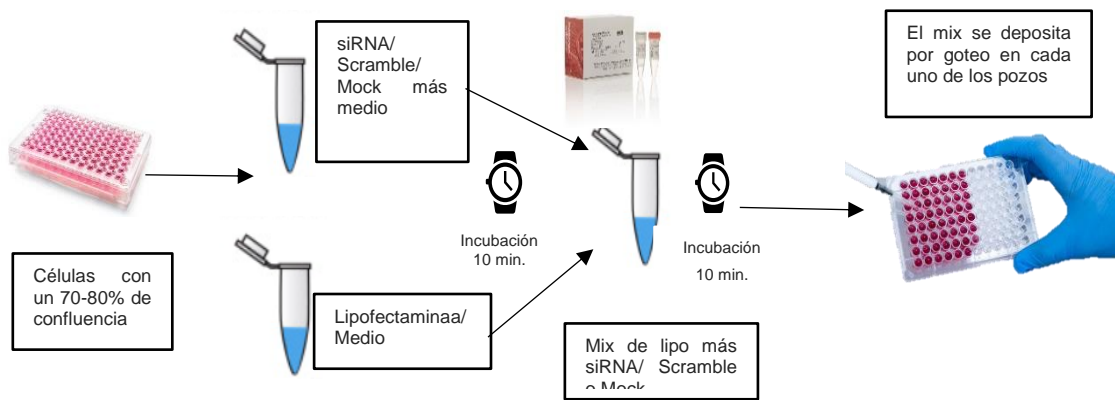
Para analizar la expresión del gen ABCB10 en cultivos 2D y 3D, se sembraron 100,000 células por pozo en una placa de 6 pozos, se utilizó el medio Hybricare suplementado con SFB al 10%, se incubaron durante 24 h para permitir que las células se adhirieran a la placa, pasados 6 días se extrajo el RNA total con trizol. Se hizo lo mismo para cultivos en 3D, sólo que en estos se sembraron 62,000 células por pozo en una placa de 6 pozos, se observó formación de los esferoides, pasados 6 días se extrajo el RNA total con trizol. El RNA se cuantificó en el NanoDrop y se corrió en un gel de agarosa al 0.8% para comprobar su integridad, posteriormente, se diseñaron primers para evaluar la expresión del gen ABCB10 en la plataforma primer3 (<https://primer3.ut.ee/>), se buscaron y descargaron las secuencias del gen ABCB10, se hizo un alineamiento múltiple y se identificaron las regiones conservadas, los *primers* se reconstituyeron con agua, quedando a una concentración de 100  $\mu$ M, posteriormente se hicieron diluciones de trabajo a 10  $\mu$ M. Las características de los *primers* fueron: Tamaño: 23 mers; Tm: 54.6 °C (F) y 54.3 °C (R) y un Contenido de GC: 39.1%. A continuación, se muestran las secuencias de la cadena sentido (forward) y antisentido (reverse).

Secuencias de primers para el gen ABCB10		
Gen ABCB10	5'-CTCATTTCCTTTGCCTGCTGTT-3'	Forward
	5'-AGTGATTGGTAAACTGGCCTAAA-3'	Reverse
Tamaño del amplicón: 111		

Las diluciones 10  $\mu$ M de cada uno de los *primers* se cargaron en un gel de agarosa al 2% para verificar su integridad, por último se realizó una qRT.PCR para analizar la expresión del gen ABCB10 tanto en 2D como en 3D.

### 9.6 Ensayo de transfección del siRNA.

Primeramente, se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos. Se empleó el medio Hybricare suplementado con SFB al 10%, se incubaron durante 24 h para permitir que las células se adhirieran a la placa, al día siguiente, se transfectaron con un siRNA específico para el gen ABCB10 a una concentración de 60 nM y se empleó como agente de transfección lipofectamina 2000 (Invitrogen). La transfección se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un volumen de 0.5 ml por pozo. Como controles, se utilizaron células sin transfectar, mock y scramble a 60 nM, se incubaron durante 48 h, se extrajo el RNA con trizol, por último, el RNA se cuantificó y se analizó su integridad en un gel de agarosa al 0.8%. Se cargaron 200 ng de muestra por carril. El ensayo de transfección se llevó a cabo usando la metodología con lipofectamina, la cual se resume en la figura 12.



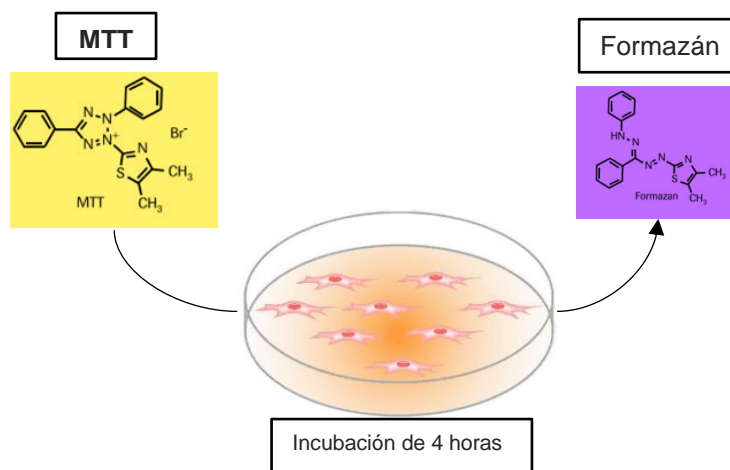
**Fig 12. Esquema del ensayo de transfección usando lipofectamina.** En la figura se resume el ensayo de transfección usando lipofectamina. Figura elaborada a partir de los datos de la información del protocolo Pub. No. MAN0007824.

### **9.7 Análisis de la inhibición de la proteína ABCB10 en células BT474 por Western Blot.**

Se sembraron 350,000 células por pozo en placas de 6 pozos. Se empleó el medio Hybricare suplementado con SFB 10%, posteriormente se incubaron durante 24 h para permitir que las células se adhiran a la placa, al día siguiente, se transfectaron con un siRNA específico para ABCB10 a 60 nM y empleando como agente de transfección lipofectamina 2000 (Invitrogen) la transfección se hizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un volumen de 2.0 ml por pozo, como controles, células sin transfectar, mock y scramble 60 nM. se incubaron durante 48 horas, pasado este tiempo se extrajeron las proteínas utilizando el amortiguador TNTE con inhibidores de proteasas. Se lisaron las células con 200 ul de TNTE por pozo, Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford, Se analizó la integridad de los extractos en SDS-PAGE al 10% teñidos con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 30 ug de proteína, ,se cargó un gel espejo para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.2  $\mu$ M y posteriormente se tiñó con Rojo de Ponceau, La membrana se incubó con anti ABCB10 (Invitrogen, PA5-30468) a una concentración 1:500 y anti GAPDH una concentración 1:1000, durante toda la noche a 4°C, Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X y se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo HRP a una concentración 1:5000, durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana fue revelada usando un sustrato quimioluminiscente (Pierce, ECL Western Blotting Substrate).

## 9.8 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de células BT474 tratadas a diferentes concentraciones de cisplatino.

De manera paralela se evaluó la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino, esto se realizó haciendo uso del ensayo de MTT, el cual es un tipo de análisis colorimétrico para medir la actividad metabólica celular. El ensayo MTT implica la conversión del colorante amarillo soluble en agua MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] en un formazán púrpura insoluble por la acción de la reductasa mitocondrial, luego se solubiliza el formazán (fig. 13) y se determina la concentración por densidad óptica a 570 nm. (Kumar *et al.*, 2018).



**Fig. 13. Ensayo de MTT.** El ensayo MTT implica la conversión del colorante amarillo soluble en agua MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] en un formazán púrpura insoluble por la acción de la reductasa mitocondrial, luego se solubiliza el formazán. Este proceso sólo ocurre en las células metabólicamente activas, por lo tanto, es útil para evaluar la actividad metabólica celular y de manera indirecta la viabilidad celular. Figura elaborada a partir de la información de Kumar *et al.*, 2018.

Para evaluar la viabilidad de las células BT474 se realizaron 3 réplicas biológicas cada una con 3 réplicas técnicas, se sembraron 12 pozos cada uno con 15,000 células en una placa de 96 pozos. Se probaron 4 concentraciones de cisplatino: 0  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . El cisplatino se utilizó a una concentración de 1mM, de ese stock se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  por pozo, para que en el pozo quede un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ , se añaden 97  $\mu\text{L}$  de medio. El tratamiento con cisplatino duró 48 horas, pasado este tiempo se retiró el tratamiento y se agregó el reactivo de MTT a una concentración de 0.5 mg/mL y se incubó durante 4 horas, pasado el tiempo de incubación se retira el MTT y se añade el reactivo de extracción, el cual es una solución de HCl 0.1 N disuelto en isopropanol. Se colocan 100  $\mu\text{L}$  por pozo, la placa se cubrió de la luz y se dejó incubarse durante 15 minutos, este paso permite solubilizar los cristales de formazán púrpura que se generan. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm.

### **9.9 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA para ABCB10 y posteriormente tratadas con cisplatino.**

Se realizaron 3 réplicas biológicas cada una con 3 réplicas técnicas con diferentes condiciones, como se muestra en la figura 12. Se sembraron 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos, al siguiente día de la siembra se transfectaron con las condiciones mostradas en la tabla 2. Se realizó un stock mix para 6 pozos para cada una de las condiciones a transfectar (mock, scramble y siRNA), previamente a cada uno de los pozos se le añadieron 80  $\mu\text{L}$  de medio suplementado con SFB sin antibiótico, y posteriormente se le agregaron 20  $\mu\text{L}$  del mix por goteo. El tiempo de transfección es de 48 horas, tiempo recomendado de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Condición	Agente transfectado	Agente transfectante	Volumen final
1) Mock	0.6 $\mu$ L agua 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
2) Scramble 60 nM	0.6 $\mu$ L scramble [10 $\mu$ M] 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
3) siRNA 60 nM	0.6 $\mu$ L siRNA [10 $\mu$ M] 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
4) Mock + cisplatino 30 nM	0.6 $\mu$ L agua 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
5) Scramble 60 nM + Cisplatino 30 nM	0.6 $\mu$ L scramble [10 $\mu$ M] 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
6) siRNA 60 nM + Cisplatino 30 nM	0.6 $\mu$ L siRNA [10 $\mu$ M] 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
7) Cisplatino 30 nM	0.6 $\mu$ L agua 10 $\mu$ L medio*	0.4 $\mu$ L lipofectamina 10 $\mu$ L medio*	100 $\mu$ L**
8) Células sin transfectar			100 $\mu$ L**

\*A cada pozo se le ponen 80  $\mu$ L de medio suplementado con SFB sin antibiótico y 20  $\mu$ L del mix.

\*\* El volumen final por pozo debe de quedar en 100  $\mu$ L.

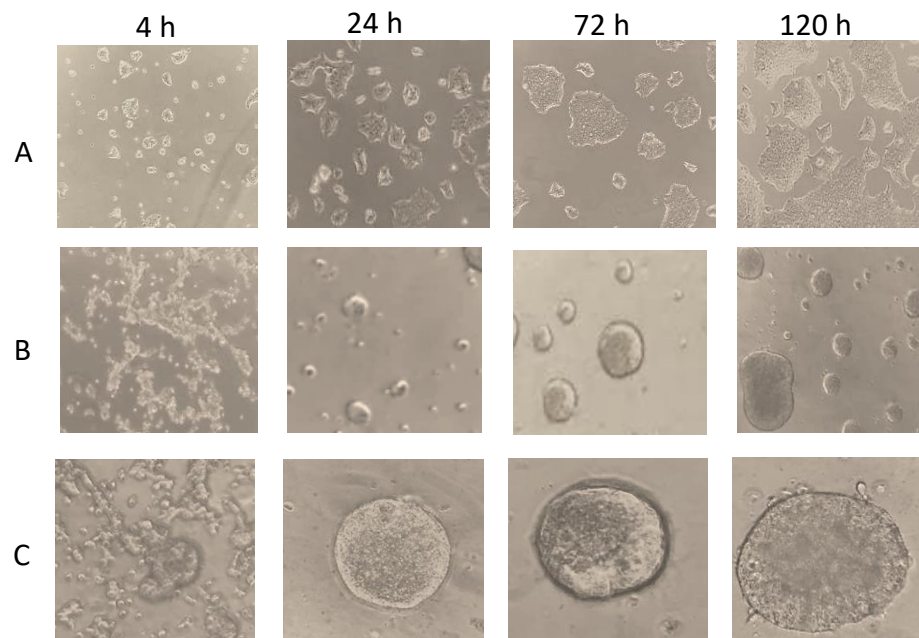
**Tabla 2. Condiciones y volúmenes utilizados para la transfección.** Se analizaron 8 condiciones las primeras 3 (mock, scramble y siRNA) se usaron como controles para evaluar que el proceso de transfección *per se* no estuviera afectando la viabilidad de las células. En las condiciones mock/cisp (4), scramble/cisp (5), siRNA/cisp (6) las células primeramente fueron transfectadas y posteriormente tratadas con cisplatino a 30nM. La condición de cisplatino (7) las células únicamente fueron tratadas con el agente transfectante y posteriormente tratadas con cisplatino, en la última condición que son las células sin transfectar (8) las células no recibieron ningún tratamiento, pero si fueron tratadas con cisplatino a la misma concentración que las otras condiciones.

En las condiciones mock (1), scramble (2) y siRNA 60 nM (3) se evaluó que las condiciones propias de la transfección no estuvieron afectando la viabilidad de las células; las columnas mock/cisplatino 30 nM (4), scramble 60 nM/cisplatino 30 nM (5) y siRNA 60 nM/cisplatino 30 nM (6) las células de estas columnas fueron también transfectadas según corresponda con el mock, scramble y siRNA, pasadas 48 horas se les añadió el cisplatino. El cisplatino utilizado para este experimento se utiliza a una concentración de 1mM, de ese stock se utilizan 3  $\mu$ L por pozo, para que en el pozo quede un volumen final de 100  $\mu$ L, se añaden 97  $\mu$ L de medio. El tratamiento con cisplatino dura 48 horas, pasado este tiempo se retira el tratamiento y se agregó el reactivo de MTT a una concentración de 0.5 mg/mL y se incubo durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se retiro el medio de cultivo y se añadió el reactivo MTT, las células se incubaron durante 4 horas, pasado el tiempo de incubación se retira el MTT y se añade el reactivo de extracción, el cual es una solución de HCl 0.1 N disuelto en isopropanol. Se colocan 100  $\mu$ L por pozo, la placa se cubre de la luz y se dejo incubar durante 15 minutos, este paso permite solubilizar los cristales de formazán púrpura que se generan. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Establecimiento de cultivos 2D y 3D de la línea celular BT474

Se llevo a cabo la estandarización del protocolo del cultivo en 3D, para ello se sembraron aprox 62,000 células de la línea celular BT474 por pozo, por triplicado, en una placa de 24 pozos, recubiertos previamente con matrigel para propiciar la formación de los esferoides, y se recubren con una capa delgada de matrigel al 5%. Los resultados mostraron la formación de estructuras esferoideas como se esperaba (fig. 14), estas condiciones de cultivo promueven un perfil transcripcional más cercano a los tumores *in-vivo* (Breslin, S. 2016).

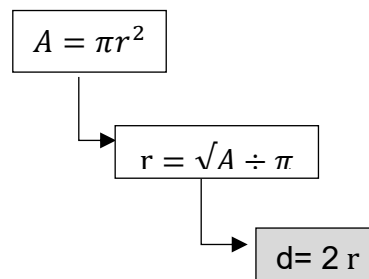
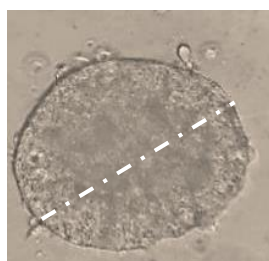
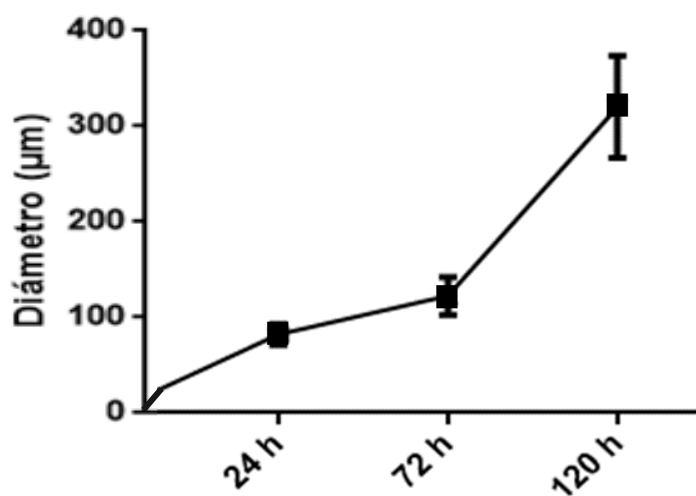


**Fig14: Resultados de los cultivos de la línea celular BT-474 a las 4, 24, 72 y 120 hrs.** (cultivada durante un periodo de 5 días). En la fila (A) se observa el cultivo en monocapa, en los cuales la morfología de las células no es uniforme, en estos cultivos en monocapa se corroboró que las células crecen juntas en parches con una pérdida de la morfología y de la polaridad celular. En la fila (B) se observa el cultivo en condiciones 3D, a un objetivo de 20x, el crecimiento en masa de las células cultivadas en estas condiciones, sugiere que existen fuertes uniones célula- célula. En la fila (C) se observan las células cultivadas en 3D a un objetivo de 40x.

Posteriormente, para realizar el análisis morfológico y estructural de los esferoides se hizo uso de diferentes softwares. Primeramente, con ayuda del software “ImageJ” (<https://imagej.nih.gov/ij/>) el cual nos permitió calcular el diámetro de los esferoides formados, asimismo se comprobó que el diámetro fue aumentando con el paso de los días hasta alcanzar su máximo a los 5 días (gráfica 1).

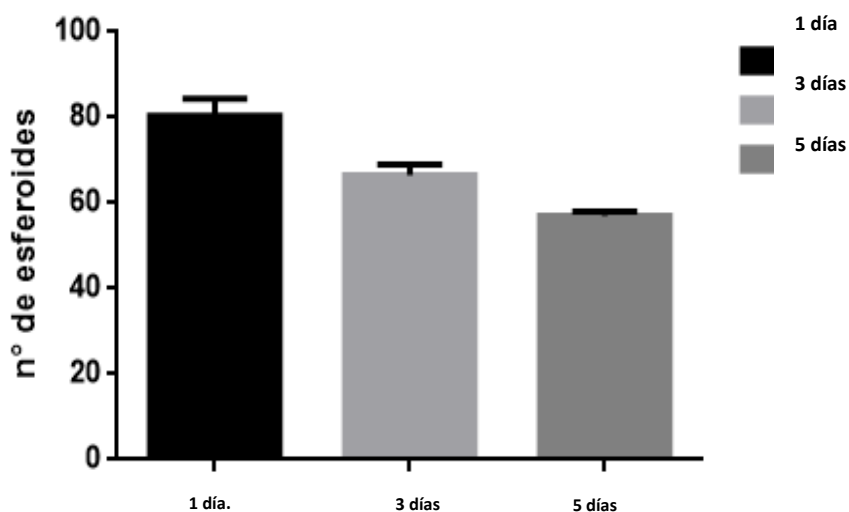
## 10.2 Análisis morfológico y estructural de los esferoides.

Los resultados del análisis morfológico de los esferoides, confirmo que estos crecen con una morfología en masa y que su tamaño aumenta con el paso de los días, hasta alcanzar un máximo de 300  $\mu\text{m}$ .



**Gráfica 1. Diámetro de esferoides.** Las imágenes tomadas se analizaron con el software ImageJ. el cual nos permite calcular el área de los esferoides, a partir de este dato utilizando la fórmula geométrica del círculo, se puede despejar el radio y calcular el diámetro de los esferoides. Se identifico que el diámetro de los esferoides fue aumentando hasta alcanzar un máximo a las 120<sup>59</sup> horas de 300  $\mu\text{m}$ .

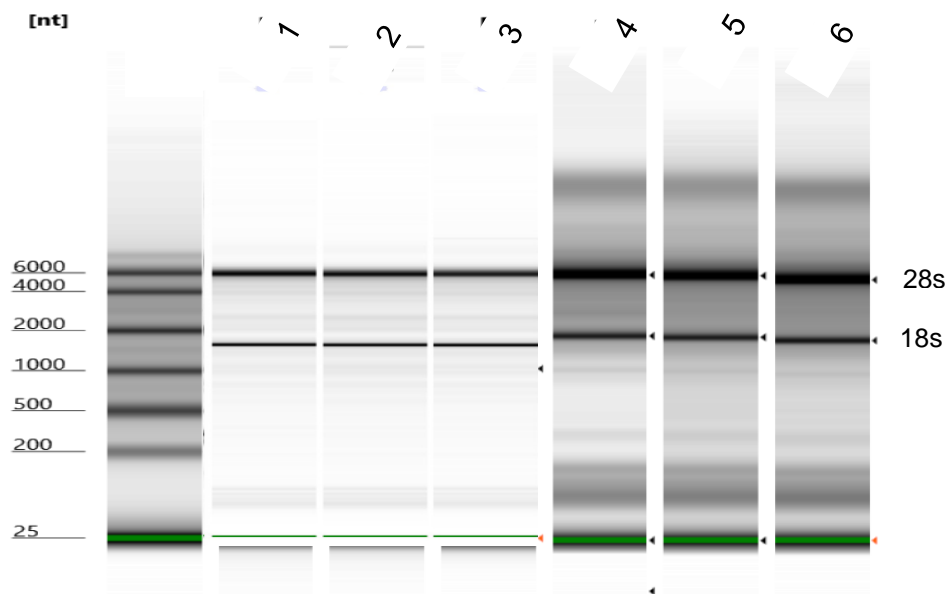
De manera paralela, se calculó el número de esferoides formados, para esto se utilizó el software CellProfiler (<https://cellprofiler.org/>) que es un software especializado en imágenes de microscopía celular que no requiere gran capacitación técnica, y nos proporciona entre otras cosas, el número de esferoides en un campo. El mayor número de esferoides se detectó a las 24 horas posteriores a la siembra, posteriormente este número fue disminuyendo (gráfica 2).



**Gráfica 2. Numero de esferoides.** Se utilizó el software CellProfiler que es un software especializado en imágenes de microscopía celular, que no requiere gran capacitación técnica, y nos proporciona entre otras cosas, el número de esferoides en un campo. El mayor número de esferoides se detectó a las 24 horas posteriores a la siembra.

### 10.3 Determinación de cambios en la expresión global de genes a nivel de RNAm en células BT474 crecidas en 2D vs 3D.

Para dar cumplimiento a este objetivo, primeramente, se extrajo el RNA total de las células cultivadas tanto en 2D como en 3D, se utilizó la técnica de Trizol. El RNA extraído se cuantificó con el equipo Agilent 2100 bioanalyzer, Este ensayo se basa en la electroforesis en chip, la cual se lleva a cabo colocando la muestra en un chip, que lo que hace es separar los componentes electroforéticamente (fig. 15), los datos obtenidos se generan en una imagen de bandeado similar a un gel y en electroferogramas. Las ventajas de este software con respecto a la electroforesis en gel de agarosa, es una menor manipulación de la muestra, y por lo tanto una menor degradación, así como una menor cantidad de muestra utilizada ya que para ácidos nucleicos se utiliza sólo 1 uL y hasta 4 uL para proteínas, al mismo tiempo este software nos proporciona una evaluación de alta precisión.



**Fig. 15 Integridad de las muestras de RNA.** Se muestra la integridad de las muestras de RNA extraído de cultivos en 2D y 3D de la línea celular BT-474. En los carriles 1, 2 y 3 se observan las bandas correspondientes a los RNA's extraídos de los cultivos en 3D, en los carriles 4, 5 y 6 se observan los RNA's extraídos de los cultivos en 2D. Se observan las bandas correspondientes a los RNA's ribosomales 28s y 18s.

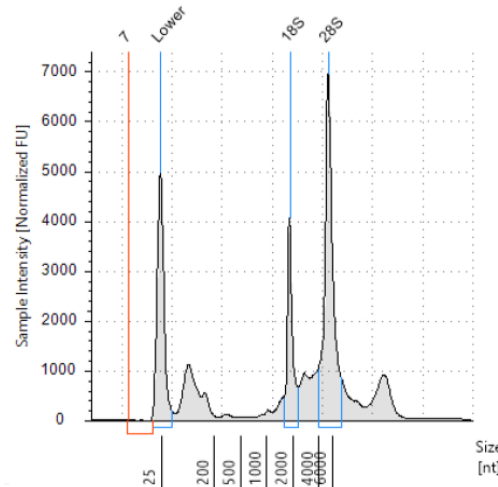
El software nos proporciona el RNA Integrity Number (RIN; el RIN asigna a un electroferograma un valor de 1 a 10, siendo 10 el menos degradado).

<b>RNA Integrity Number (RIN)</b>						
<b>#</b>	<b>ID muestra</b>	<b>RIN</b>	<b>RNA (ng/μL)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>ID gel</b>
<b>1</b>	<b>1_2D</b>	<b>8.4</b>	<b>417.99</b>	<b>1.95</b>	<b>2.09</b>	<b>B1</b>
<b>2</b>	<b>2_2D</b>	<b>8.0</b>	<b>394.07</b>	<b>1.94</b>	<b>2.10</b>	<b>C1</b>
<b>3</b>	<b>3_2D</b>	<b>8.4</b>	<b>405.91</b>	<b>1.96</b>	<b>2.10</b>	<b>D1</b>
<b>4</b>	<b>1_3D</b>	<b>10.0</b>	<b>183.85</b>	<b>1.89</b>	<b>1.50</b>	<b>E1</b>
<b>5</b>	<b>2_3D</b>	<b>9.6</b>	<b>182.72</b>	<b>1.93</b>	<b>1.48</b>	<b>F1</b>
<b>6</b>	<b>3_3D</b>	<b>9.6</b>	<b>213.23</b>	<b>1.88</b>	<b>1.59</b>	<b>G1</b>

**Tabla 3. Cuantificación de las muestras de RNA** extraído de los cultivos en 2D y 3D. Valores de RIN o integridad del RNA, absorbancia a 260/280, 260/230.

El software bioanalyzer muestra resultados como la concentración de la muestra y la denominada relación ribosómica. Debido a que los ARNr 28S y 18S de mamíferos tienen un tamaño de aproximadamente 5 kb y 2 kb, la relación teórica 28S: 18S es aproximadamente 2,7: 1; pero una relación de 2: 1 se ha considerado durante mucho tiempo el punto de referencia para el ARN intacto (Agilent Tech, 2018). La relación de ARN total se calcula tomando la relación entre el área bajo los picos de ARNr 18S y 28S y el área total debajo del gráfico. En los siguientes electroferogramas, el eje X representa el tamaño de los fragmentos en nucleótidos y el eje Y representa la longitud de onda de fluorescencia (Agilent Tech, 2018).

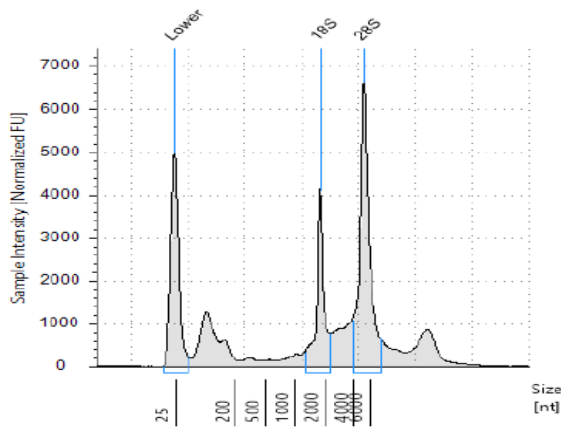
Gráfica 3.  
Electroferograma 1\_3D



Relación ribosómica  
2:1

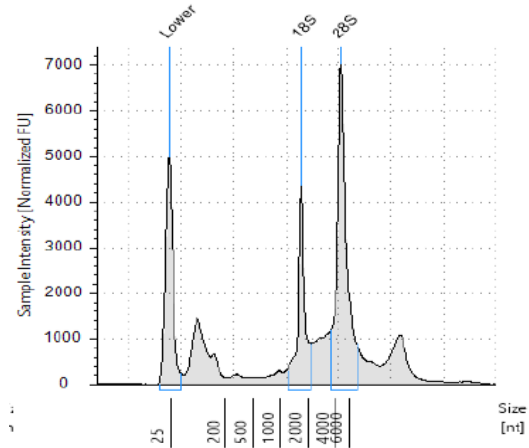
RIN: 10.0  
A260/280: 1.89

Gráfica 4.  
Electroferograma 2\_3D



RIN: 9.6  
A260/280: 1.93

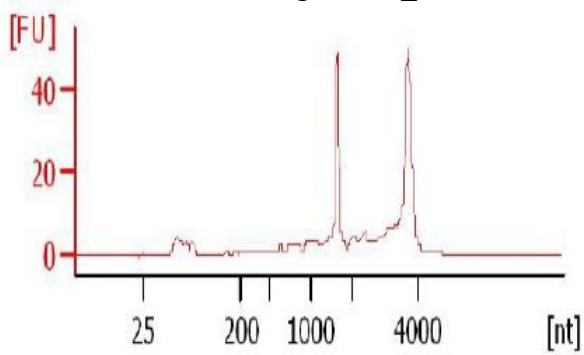
Gráfica 5.  
Electroferograma 3\_3D



RIN: 9.6  
A260/280: 1.88

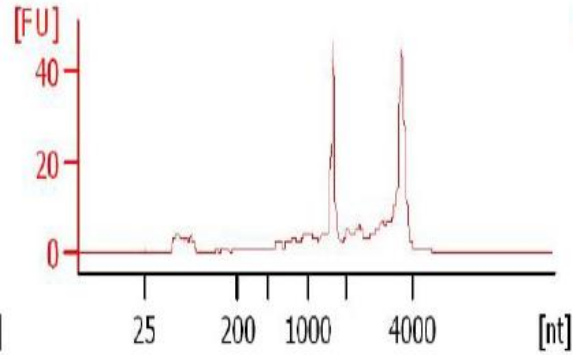
**Gráficas 3, 4 y 5. Electroferogramas que muestran la integridad de las muestras de RNA extraído de células BT474 cultivadas en 3D.** Los picos más hacia la derecha corresponden a los RNA's ribosomales 18s y 28s. El eje X representa el tamaño de los fragmentos en nucleótidos (nt) y el eje Y representa la longitud de onda de fluorescencia.

Gráfica 6  
Electroferograma 1\_2D



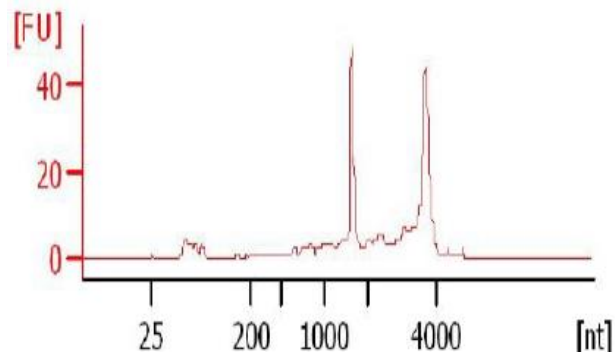
RIN: 8.4  
A260/280: 1.95

Gráfica 7  
Electroferograma 2\_2D



RIN: 8.0  
A260/280: 1.94

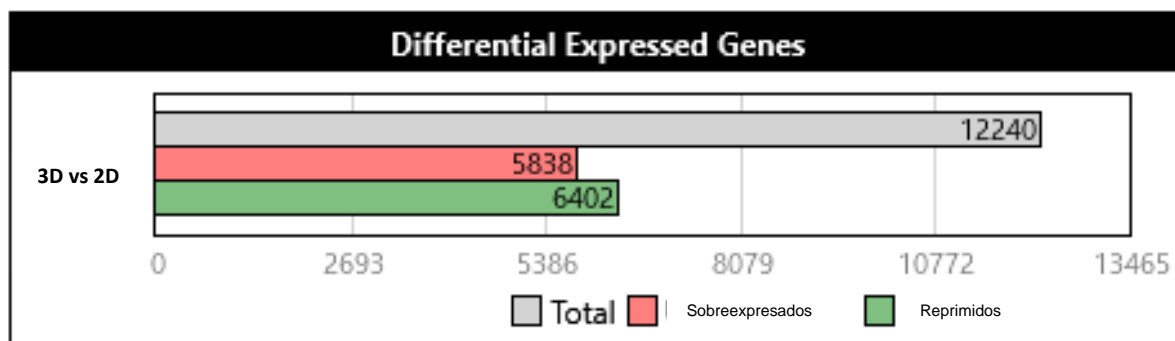
Gráfica 8  
Electroferograma 3\_2D



RIN: 8.4  
A260/280: 1.96

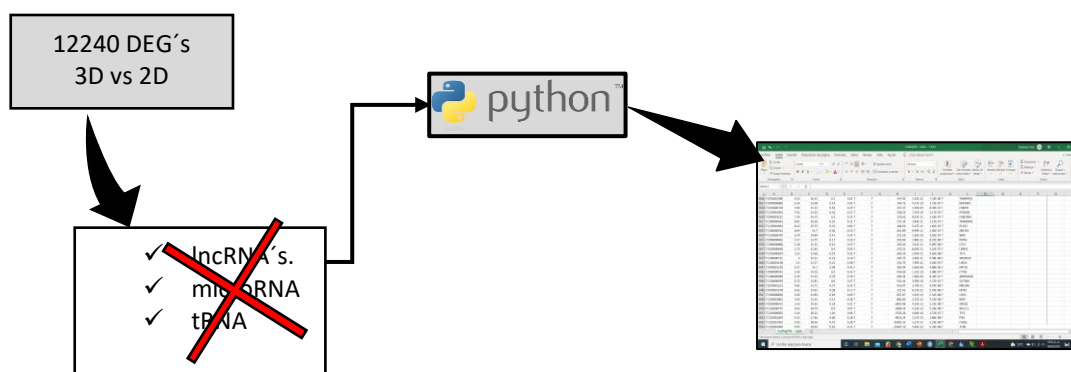
**Gráficas 6, 7 y 8. Electroferogramas que muestran la integridad de las muestras de RNA extraído de células BT474 cultivadas en 2D.** Los picos más hacia la derecha corresponden a los RNA's ribosomales 18s y 28s. El eje X representa el tamaño de los fragmentos en nucleótidos (nt) y el eje Y representa la longitud de onda de fluorescencia.

Para continuar con el cumplimiento de este objetivo se llevó a cabo un ensayo de microarreglos con el RNA extraído de ambos tipos de cultivo, las muestras de RNA que cumplieron con la integridad (RIN > 8), una buena cuantificación y una calidad aceptable, recordando que el RNA de calidad aceptable no contiene proteínas contaminantes, DNA, etanol, fenol ni sales; asimismo para evaluar la Para evaluar la calidad del RNA, se determina su absorbancia a 260/280, el RNA de calidad aceptable está en el rango de 1,7 a 2,1 (Agilent Tech. 2018). Dichas muestras se usaron para el ensayo de microarreglos, los cuales son un tipo de ensayo que permiten generar perfiles de expresión a nivel transcriptoma, y por lo tanto son útiles para la detección de genes expresados diferencialmente (DEG). Dado que estamos en comparar la expresión génica, una de las muestras analizadas sirve como control y la otra sería nuestra condición particular. En nuestro análisis de microarreglos hubo 12,240 (fig. 16) se consideraron como DEG, para esto debían cumplir ciertos criterios de filtraje 1) valor de Fold Change (FC) <-2 o >2 2) *p-value* <0.05 y 3) FDR *p-value* <0.05. De los 12240 genes, 5838 de ellos fueron sobreexpresados y 6402 reprimidos.

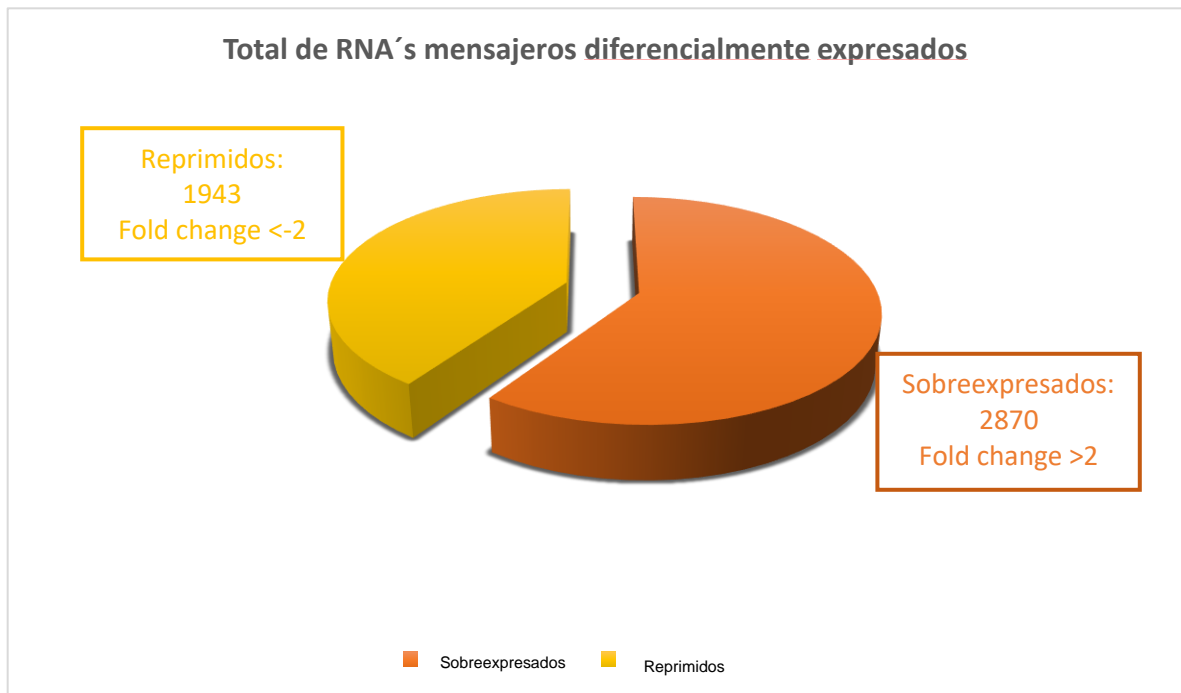


**Fig. 16. Total de Genes expresados diferencialmente en nuestro análisis 3D vs 2D.** La figura muestra a todos los genes que se identificaron como diferencialmente expresados, estos incluyen a RNA's mensajeros, RNA's largos no codificantes, microRNA's, RNA's nucleares, RNA's nucleolares y tRNA's.

Dado que el objetivo general de este proyecto es evaluar el efecto del cultivo en 3 dimensiones a nivel transcripcional, realizamos una discriminación de los RNAm de todo el pool de RNA's identificados en nuestro ensayo; para esto, primeramente, los clasificamos de acuerdo al subgrupo en el que el software los ubico: Multiple complex, Noncoding, Coding, Unassigned, Pseudogene, premiRNA, small RNA, ribosomal y tRNA. Posteriormente nos quedamos únicamente con los genes de los grupos multiple complex, coding, pseudogene y unassigned, a partir de estos se procedió a ubicar los ID y nombres en base de datos como NCBI y UniProt para corroborar que fueran genes anotados y codificantes, se descartaron todos aquellos genes no anotados. Posteriormente, para continuar con nuestro análisis se realizó un filtraje de los genes identificados, para quedarnos únicamente con aquellos que fueran RNAm codificantes para proteínas, para esto se utilizó el programa Phyton, que nos permitió llegar a un archivo con únicamente 4813 RNAm, de los cuales 2870 estaban sobre-expresados, con un valor de fold change mayor a 2, y 1943 estaban reprimidos, con un valor de fold change menor a -2 (gráfica 9).

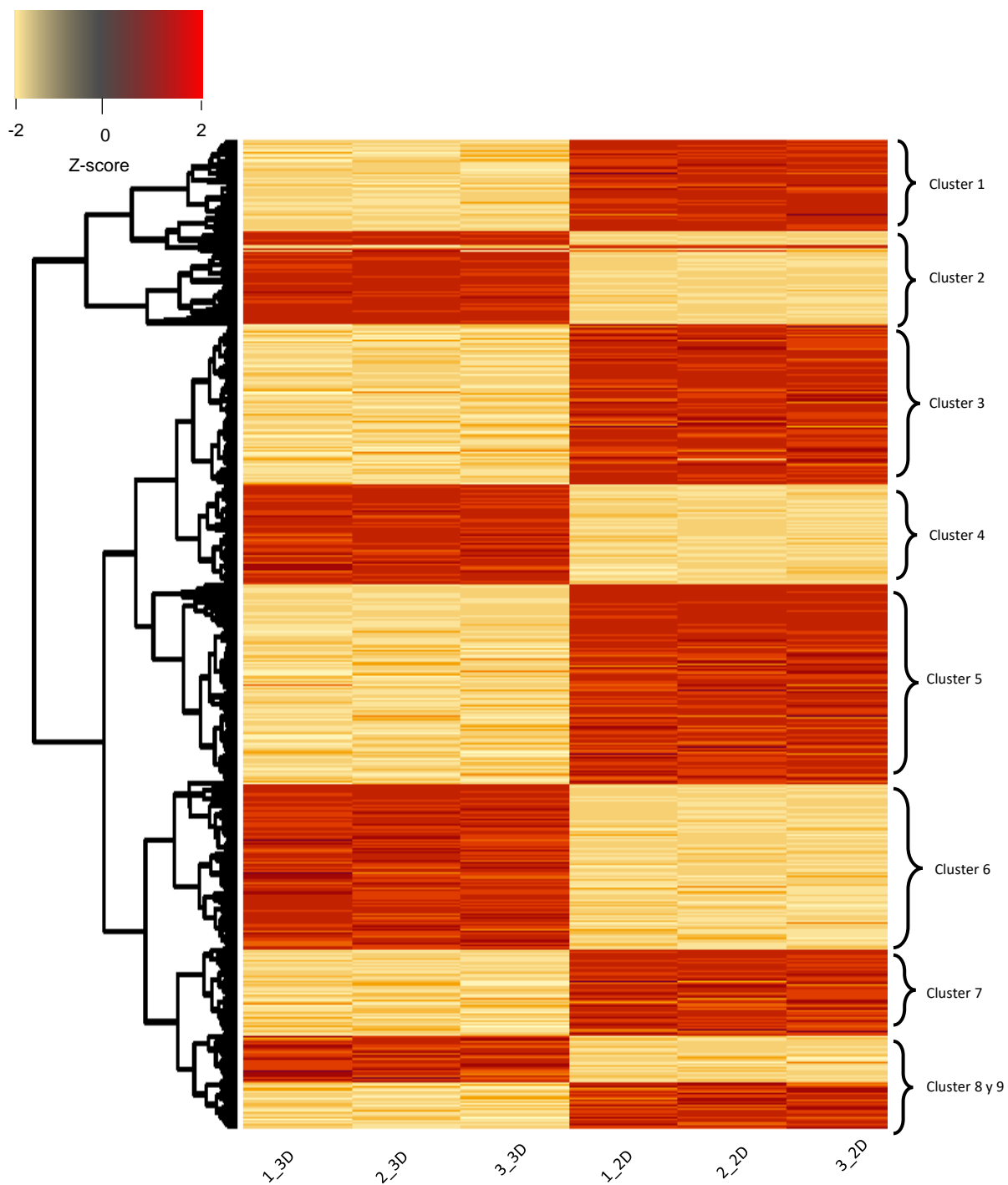


**Fig. 17. Esquema de trabajo de filtraje.** En el esquema se muestra el diagrama de flujo de filtraje, se hizo uso del software de programación Python para analizar los datos y quedarnos únicamente con los RNA's que se identificaban como RNA's mensajeros, dichos RNA's están identificados en nuestros datos crudos como "mRNA".



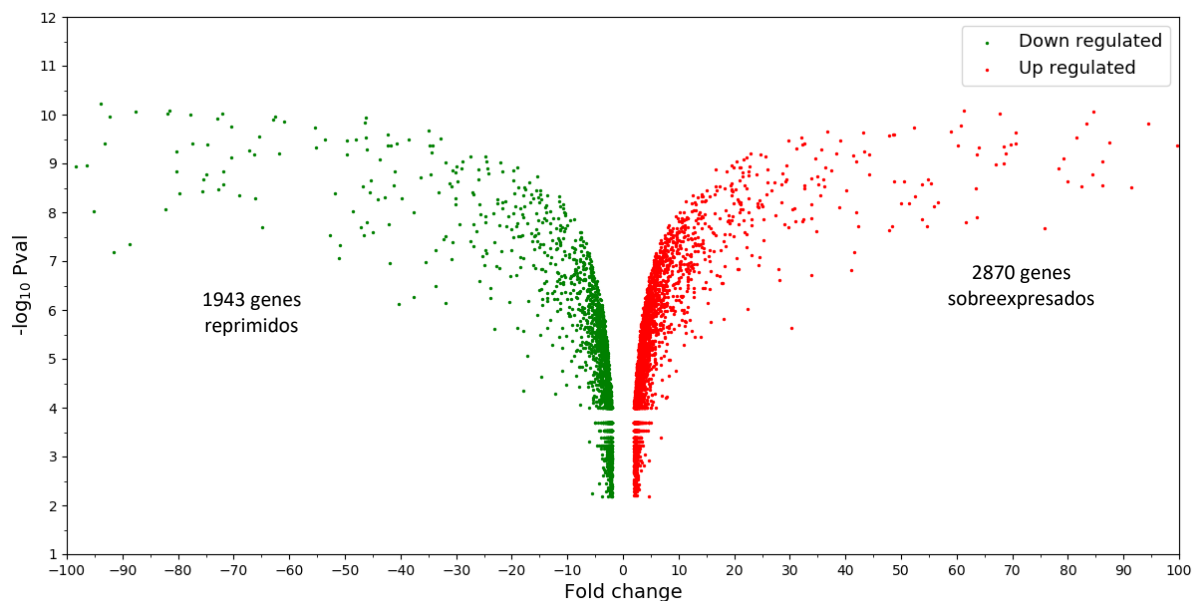
**Gráfica 9. Total de RNA's mensajeros filtrados y considerados como diferencialmente expresados en cultivos 3D vs 2D.** Se graficaron los 4813 RNA's mensajeros considerados como reprimidos (amarillo) y sobreexpresados (naranja). Los RNA's mensajeros de este gráfico tenían un valor de Fold Change >2 (sobreexpresados) y un Fold Change <2 (reprimidos).

Una vez teniendo este set de genes, se realizó un *heat map* o mapa de calor para identificar huellas de expresión entre ambos tipos de condiciones (fig. 18).



**Fig. 18. Heat Map.** En la figura se muestran los RNA´s mensajeros expresados diferencialmente entre las condiciones de cultivo en 3D vs 2D. En este mapa de calor se comparó la expresión que tuvieron los 4813 RNA´s mensajeros considerados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Se identifican claras huellas de expresión entre ambos tipos de condiciones.

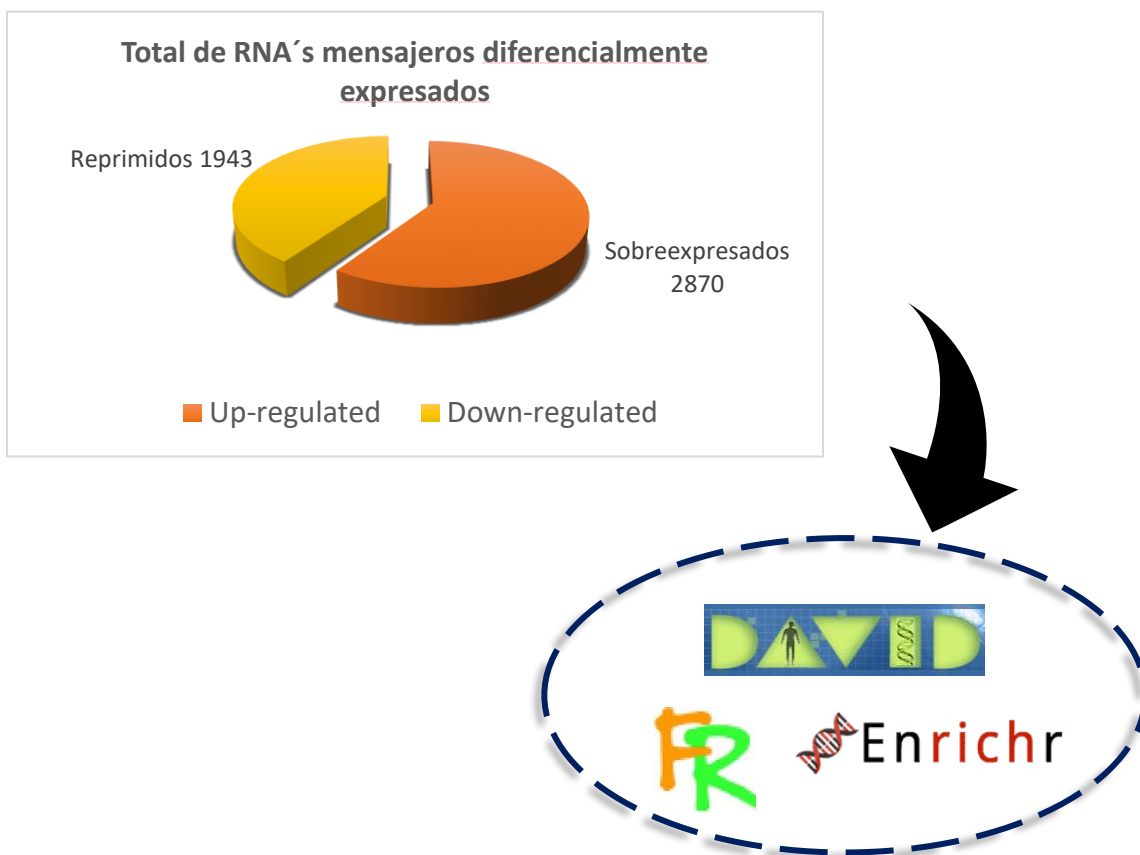
Los heat maps son una herramienta muy utilizada para evaluar la expresión diferencial entre dos tipos de condiciones generalmente una patológica y una normal, para nuestro caso sería la expresión diferencial entre dos tipos de condiciones de cultivo. Este tipo de mapa de calor nos permite evaluar visualmente la expresión diferencial entre 2 condiciones. En este heat map, se muestra la expresión de 4813 genes así como la uniformidad entre nuestras replicas, tanto en 3D como en 2D. Por último, para evaluar la expresión diferencial de los genes en ambos tipos de condiciones de cultivo, se elaboro un Volcano plot, que es otra herramienta que nos permite analizar esta expresión diferencial. Un volcano plot es un diagrama de dispersión que ubica al valor de  $p$  como  $-\log_{10}$  en el eje vertical en función del valor de Fold Change en el eje horizontal. Los valores de  $p$  más bajos corresponden a las diferencias estadísticamente más significativas, y se encuentran en la parte superior del gráfico. En este tipo de gráficos, los genes con diferencia estadísticamente significativa y fold change se encuentran en los extremos superiores derecho e izquierdo (fig 19).



**Fig. 19. Volcano plot.** En la figura se muestran los RNA's mensajeros sobreexpresados y reprimidos en nuestroo ensayo de microarreglos. Un volcano plot es un diagrama de dispersión que ubica al valor de  $p$  como  $-\log_{10}$  en el eje vertical en función del valor de Fold Change en el eje horizontal. En este tipo de gráficos, los genes con diferencia estadísticamente significativa y fold change se encuentran en los extremos superiores derecho e izquierdo. En este volcano plot se graficaron los 4813 RNA's mensajeros considerados como diferencialmente expresados, en verde

#### 10.4 Análisis bioinformático de los RNA's mensajeros diferencialmente expresados.

A partir de los RNA's mensajeros identificados como DEG en nuestro microarreglo, lo que nos permitió llegar a un archivo con 4813 transcritos, de los cuales 2870 estaban sobre-expresados y 1943 reprimidos en la condición 3D con respecto a la condición 2D (fig. 19), para llevar a cabo los análisis bioinformáticos de estos transcritos se procedió a hacer uso de diferentes programas y bases de datos, las 3 principales fueron DAVID, FunRich y Enrichr, esta última fue la que mejores resultados nos ofreció, y la que reconoció un mayor porcentaje de los genes ingresados, lo cual es útil para que los resultados de nuestros análisis posteriores tengan un mejor respaldo.

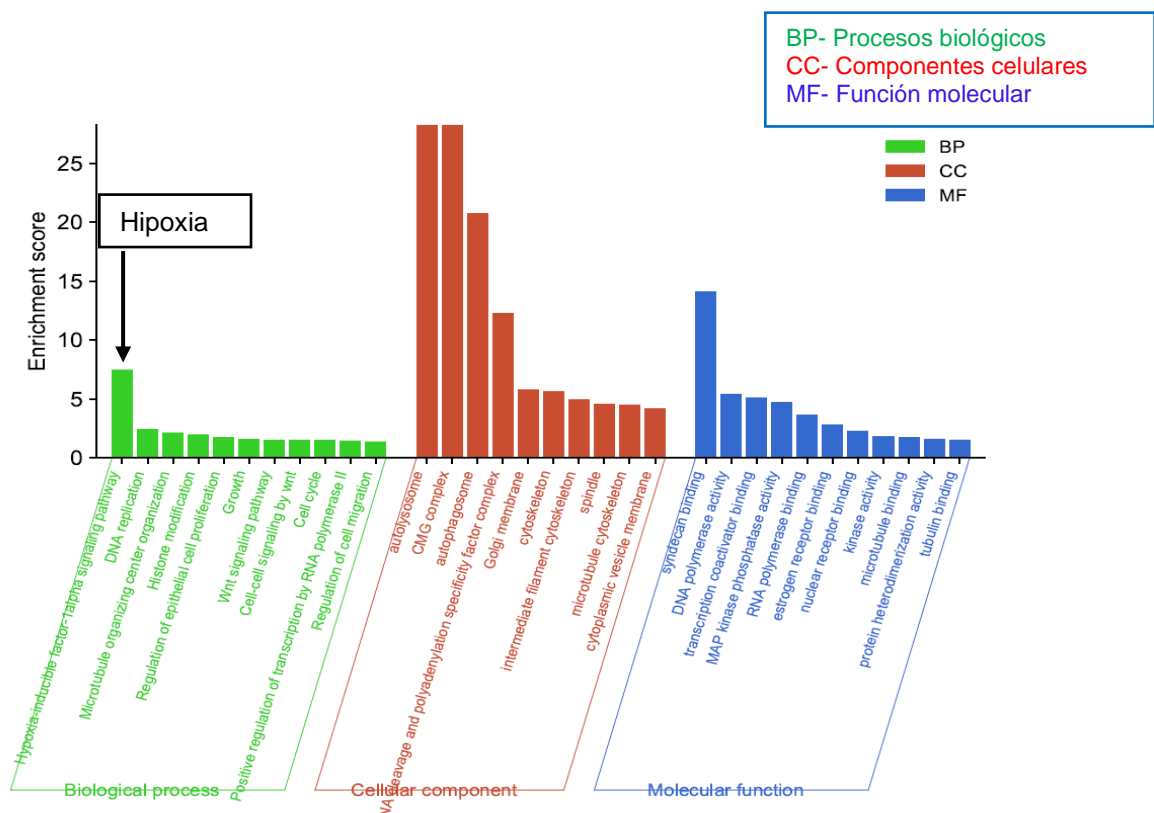


**Fig. 20. Diagrama de flujo para el análisis de los RNA's mensajeros diferencialmente expresados.** Se esquematiza como se llevó a cabo el análisis bioinformático de los 4813 RNA's mensajeros considerados como DEG, se usaron diferentes plataformas y bases de datos como DAVID, Enrichr y FunRich con el fin de analizar vías y procesos enriquecidos.

La plataforma Enrichr, es una plataforma muy amigable que nos permite clasificar nuestros genes en diferentes procesos y vías de señalización, haciendo un match entre los genes ingresados contra los genes almacenados en su base de datos. Se ingresaron por separado los archivos de genes sobre y sub expresados en la condición 3D, ya que todo este set de genes es de nuestro particular interés. Primeramente, para los genes sobre expresados, Enrichr nos arrojó un total de 43 vías y procesos enriquecidos con estos genes, de igual forma para los genes reprimidos, pero para estos nos ofreció un total de 192 (fig. 20). Sin embargo, no todas estas vías y procesos eran relevantes para nuestro modelo de estudio, es por eso que para hacer un análisis más fino, se procedió a corroborar en la literatura, en bases de datos como PubMed y Springer, cuales de estos procesos eran relevantes para su estudio en cáncer de mama. Con la información obtenida, primeramente, se procedió a hacer un análisis de Ontología de genes o Gen Ontology (GO), es este tipo de análisis son útiles ya que agrupan a nuestros genes en 3 categorías que corresponden con 3 aspectos diferentes de la biología celular (GeneOntology.org). 1) **Procesos biológicos**: Estos implican generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas, 2) **Componentes celulares**: Se refiere al espacio celular donde se encuentra el producto génico y 3) **Función molecular**: Describe actividades que ocurren a nivel molecular (GeneOntology.org).

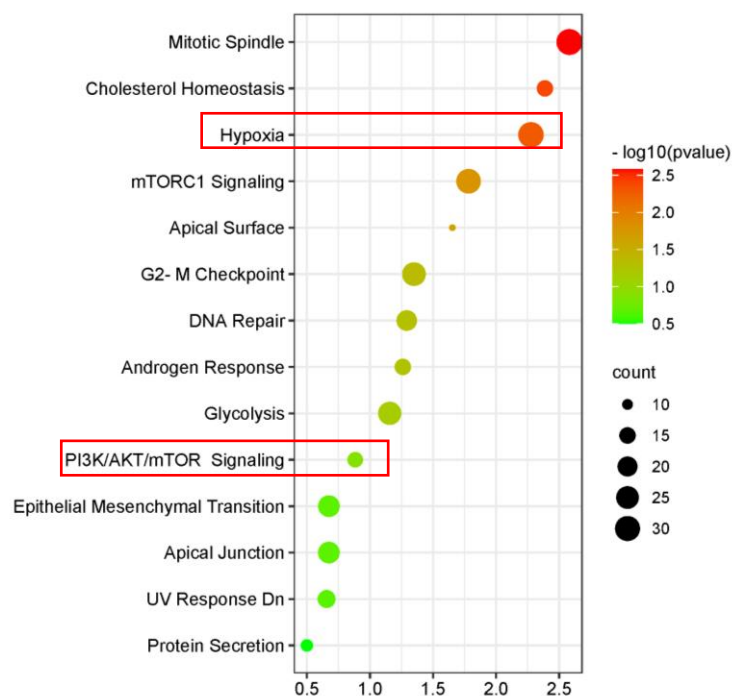
## 10.5 Rutas y vías de señalización asociados a *hallmarks* del cáncer

En los genes sobreexpresados los procesos biológicos mayormente enriquecidos fueron la replicación del DNA, organización de microtúbulos, migración celular y la del factor inducible de hipoxia. Este último es de nuestro particular interés ya que alude a las condiciones bajas de oxígeno, y es que a medida que disminuye la tensión de oxígeno, las células tumorales se adaptan al suministro limitado de éste (gráfica 10), algunos estudios han demostrado que tal adaptación conduce a un fenotipo más agresivo que es resistente a muchas terapias contra el cáncer (Courtney, E. 2021).



**Gráfica 10. Análisis de Gen Ontology (GO).** La gráfica muestra el GO de los 2870 RNA's mensajeros sobreexpresados en la condición 3D con respecto a 2D. Los análisis de GO nos permitieron identificar que la hipoxia era uno de los procesos biológicos enriquecidos con estos mensajeros.

Al mismo tiempo, realizamos un análisis de vías en la plataforma Enrichr, y corroboramos el enriquecimiento de la ruta de hipoxia (gráfica 11), de manera paralela a esta vía, la ruta de PI3K/AKT/mTOR, la cual esta activada de manera constitutiva en los tumores HER2+, (fig. 21) representa una ruta alterna para la expresión y la actividad transcripcional del factor inducible de hipoxia HIF1 $\alpha$  en condiciones no hipóxicas (Sena *et al.*, 2014). El receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2), el cual esta amplificado en el 15 a 30% de los cánceres de mama, activa la vía de la fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3-kinasa/AKT serina/treonina kinasa (PI3K/AKT), lo que conduce a un aumento, tanto de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , como de la actividad transcripcional en condiciones no hipóxicas. (Courtney E. 2021).



**Fig 21. Análisis de vías de enriquecimiento de los RNA´s mensajeros sobreexpresados en 3D.** En nuestro análisis de vías comprobamos el enriquecimiento de la ruta de hipoxia. Asimismo, identificamos el enriquecimiento de la vía de PI3K/AKT/mTOR, la cual esta activada de manera constitutiva en los tumores HER2+, y que representa una ruta alterna para la expresión y la actividad transcripcional del factor inducible de hipoxia HIF1 $\alpha$  en condiciones no hipóxicas (Sena *et al.*, 2014).

## 10.6 Identificación de RNA's mensajeros sobreexpresados en 3D y asociados a resistencia a terapia.

Dado lo anterior, los tumores HER2-positivos, y negativos para el supresor de tumoral PTEN pueden tener niveles altos de HIF-1 $\alpha$  y por lo tanto un incremento en la resistencia a drogas, ya que HIF-1 activa río abajo a genes involucrados en la resistencia a drogas, incluidos algunos transportadores tipo ABC (Courtney E. 2021).

Dado lo anterior, nos dimos a la tarea de identificar aquellos genes asociados a resistencia a terapia que se sobre expresaron en la condición de cultivo en 3D con respecto al cultivo en 2D, para esto se hizo un match de todo nuestro set de genes sobre expresados vs la firma genética "Creighton\_endocrine\_therapy\_resistance\_1\_and\_2" de la plataforma GSEA, la cual contiene una colección de conjuntos de genes que expresan ESR1 (receptor de estrógeno) y ERBB2 (HER2). De todos nuestros genes sobreexpresados, sólo 158 genes hicieron match vs esta firma genética, es decir estos estaban asociados a resistencia a terapia (tabla 4).

Genes Up-regulated (en microarreglo) vinculados a resistencia a terapia					
PGR	EFCAB2	HNRNPA0	ESR1	REEP1	SUPT16H
GREB1	DKK1	HACD1	PALLD	KIF24	IRX4
MGP	AREG	PKIB	FLNA	MYOF	CDK2
NRCAM	SLC7A2	RALGPS1	PKIG	CA2	CLUAP1
NPY1R	VEPH1	RBBP8	BTG2	PMVK	ZNF346
PRPS2	BCL2	ELP2	ZNF606	MYBL1	KLK11
AFF3	MSL3	HMGB2	THYN1	PABPN1	ASPM
HEY2	GPER1	GPX8	DSP	MLF1	ABCB10
INPP4B	SLC39A6	TTL	PARP1	RSRC1	
NAALADL2	PTEN	TKFC	MYH10	NEK11	
DMKN	GFRA1	COL12A1	ZNF20	THSD4	
OLFM1	SFXN3	ERBB4	SVIL	BDH2	
STC2	C1QTNF6	ADAMTS19	SYTL5	TRIM24	
USP32	ARMT1	CEP70	STRBP	TCEAL1	
RIMS2	ECI2	SPATA6	RHNO1	WDR89	
NR2F2	IGF1R	SEMA6A	ATP8B2	SLC38A2	
PDCD4	IQCG	SUZ12	RIBC2	CXCL12	
SPOP	PPM1K	TNPO2	TSGA10	TMEM67	
DTNA	PFN2	AGR3	KLHDC9	CFAP70	
SIAH2	PHF19	ZNF703	CCDC191	CFAP53	
PRR11	SHANK2	NETO2	FUT8	CAD	
MAPT	SMYD3	PCM1	HOXC6	SNRPE	
PTPRG	SYTL2	CCT6B	TMPRSS3	COPRS	
AP1S2	CDH3	TPBG	TCAF1	IQCK	
SGK3	MEX3C	DHFR	RMND1	RPGR	
FAM83B	TMCC1	SDAD1	PYROXD2	TPX2	
GATA3	ARL2	PNMA1	CD99	MCM3	
PHF10	PRLR	MSI2	TCEAL4	CCDC113	
SGK3	IL1RN	ZNF432	PLCB1	EVL	
TBL1X	RERG	NTAN1	FKBP4	NRIP1	

**Tabla 4. Lista de genes (RNAm) asociados a resistencia a terapia.** En la tabla se muestran 158 RNAm sobreexpresados en nuestro ensayo de microarreglos y que se identificaron como genes asociados a resistencia a terapia de acuerdo a los datos reportados en la firma genética del GSEA "Creighton\_endocrine\_therapy\_resistance\_1\_and\_2". la cual contiene una colección de conjuntos de genes que expresan ESR1 (receptor de estrógeno) y a HER2 igual que nuestra línea celular.

Valores de AUC de genes Up-regulated					
Gen	AUC	Fold Change	Gen	AUC	Fold Change
CCT6B	0.63	3.76	SLC39A6	0.644	9.52
ZNF606	0.607	3.43	NPY1R	0.61	369.94
STRBP	0.605	3.2	GATA3	0.628	14.95
KLHDC9	0.657	2.93	BCL2	0.61	11.34
NEK11	0.62	2.41	ERBB4	0.61	4.25
TMEM67	0.71	2.25	AGR3	0.733	3.97
COPRS	0.63	2.18	ZNF703	0.68	3.96
GFRA1	0.637	8.38	CCT6B	0.63	3.76
IGF1R	0.635	6.99	ESR1	0.658	3.58
RERG	0.672	4.7	EVL	0.603	2.15
SYTL5	0.653	3.25	ABCB10	0.65	4.59
THSD4	0.618	2.4	ASPM	0.602	2

**Tabla 5. Lista de genes (RNAm) con un valor de AUC > 6.** En la tabla se muestran 24 RNAm sobreexpresados en nuestro ensayo de microarreglos, que se identificaron asociados a resistencia a terapia (GSEA) y que además tuvieron un valor de AUC > 6, lo cual los ubica como potenciales biomarcadores en cáncer con potencial uso clínico.

Posteriormente, con la plataforma ROC, la cual nos permite realizar un análisis de curva ROC, acrónimo de Receiver Operating Characteristic o Característica Operativa del Receptor. Este análisis nos ayuda a vincular la expresión génica y la respuesta a la terapia utilizando datos a nivel transcriptómico de pacientes con cáncer de mama, ovario y colorrectal. El análisis de curva ROC fue utilizado para evaluar el poder como biomarcador clínico de los genes previamente identificados. Biomarcador es una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal de una afección o de una enfermedad. Para llevar a cabo nuestros análisis se utilizaron las muestras del grupo con una respuesta patológica completa (n=1775).

Valor de AUC	Efecto
<0.6	Sin efecto de utilidad clínica.
0.6	Poco efecto de utilidad clínica
0.6- 7	Biomarcador en cáncer con potencial uso clínico
>7	Biomarcador clínico en cáncer

Con base en los análisis anteriores se decidió analizar funcionalmente al gen ABCB10, debido a su valor de AUC (0.65) lo que lo coloca en la categoría de biomarcador en cáncer con potencial uso clínico; así como a su sobreexpresión en pacientes que no respondieron a terapia, lo cual estaría evidenciando su probable participación en la resistencia a fármacos y por último por su sobreexpresión en muestras de tejido tumoral mamario vs muestras de tejido normal de mama.

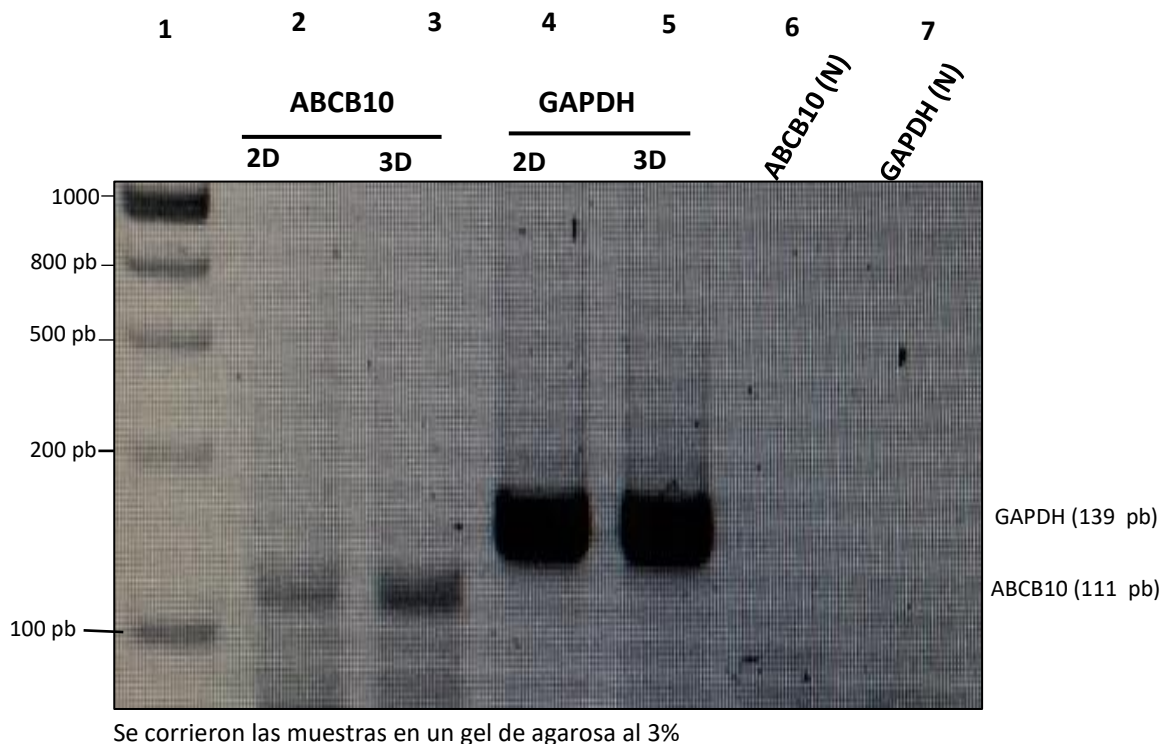
### 10.7 Análisis de expresión del gen ABCB10 en células BT474 cultivadas en 2D y 3D.

Una vez teniendo identificado a nuestro gen de interés, para poder evaluar su expresión, se diseñaron *primers* específicos, haciendo uso de la plataforma Primer3, el cual es ampliamente utilizado para diseñar *primers* para PCR (Polymerase Chain Reaction), cabe recordar que la PCR es una herramienta esencial en genética y biología molecular. Para llevar a cabo esto, primeramente, se buscaron y descargaron las secuencias del gen ABCB10, se encontraron 3 secuencias, el gen parental y 2 variantes del gen. Se hizo un alineamiento múltiple y se identificaron las regiones conservadas, posteriormente, haciendo uso de la plataforma primer3 se diseñaron oligos que fueran complementarias a las 3 variantes del gen. (fig 22).

Tabla 3. primers para el gen ABCB10		
Gen ABCB10	5'-CTCATTTTCTTTGCCTGCTGTT-3'	Forward
	5'-AGTGATTGGTAAACTGGCCTAAA-3'	Reverse
Tamaño del amplicón: 111		

**Fig 22. Secuencias de oligonucleótidos dirigidas a las variantes del gen ABCB10.** Las características de los primers fueron: Tamaño: 23 mers; Tm: 54.6 °C (F) y 54.3 °C (R) y un Contenido de GC: 39.1%.

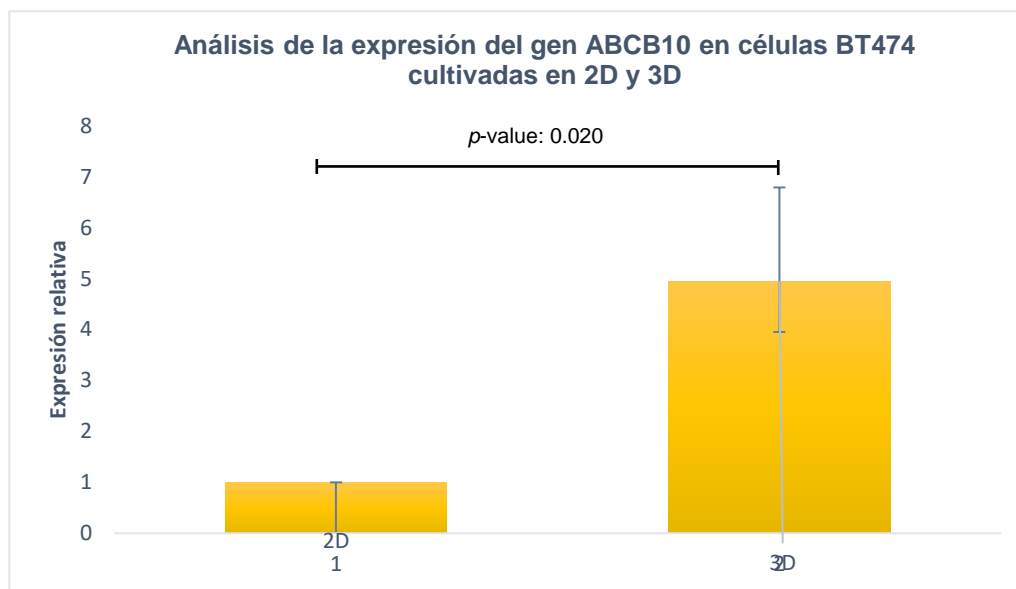
Posteriormente, para corroborar los datos del microarreglo (Clariom D) que realizamos, se llevo a cabo una qRT-PCR para analizar la expresión del gen ABCB10 tanto en 2D como en 3D (fig. 23).



**Fig. 23. Gel de agarosa al 3% en donde se corrieron las muestras de nuestro ensayo de qRT-PCR,** En el gel se cargaron 5uL de muestra por carril. Carril 1) Marcador de talla, Carril 2) ABCB10 en 2D; Carril 3) ABCB10 en 3D; Carril 4) GAPDH en 2D; Carril 5) GAPDH en 3D; Carril 6) ABCB10 más agua y Carril 7) GAPDH más agua. Con este ensayo pudimos comprobar la sobreexpresión del gen ABCB10 en 3D vs 2D usando como control a GAPDH.

Se confirmo la sobre-expresión del gen ABCB10, reportada previamente en nuestro ensayo de microarreglos en condiciones 3D con respecto a la condición en 2D (carriles 2 y 3), en este ensayo se uso como control a GAPDH (carriles 4 y 5) y como control negativo se utilizó una condición con agua (carriles 6 y 7).

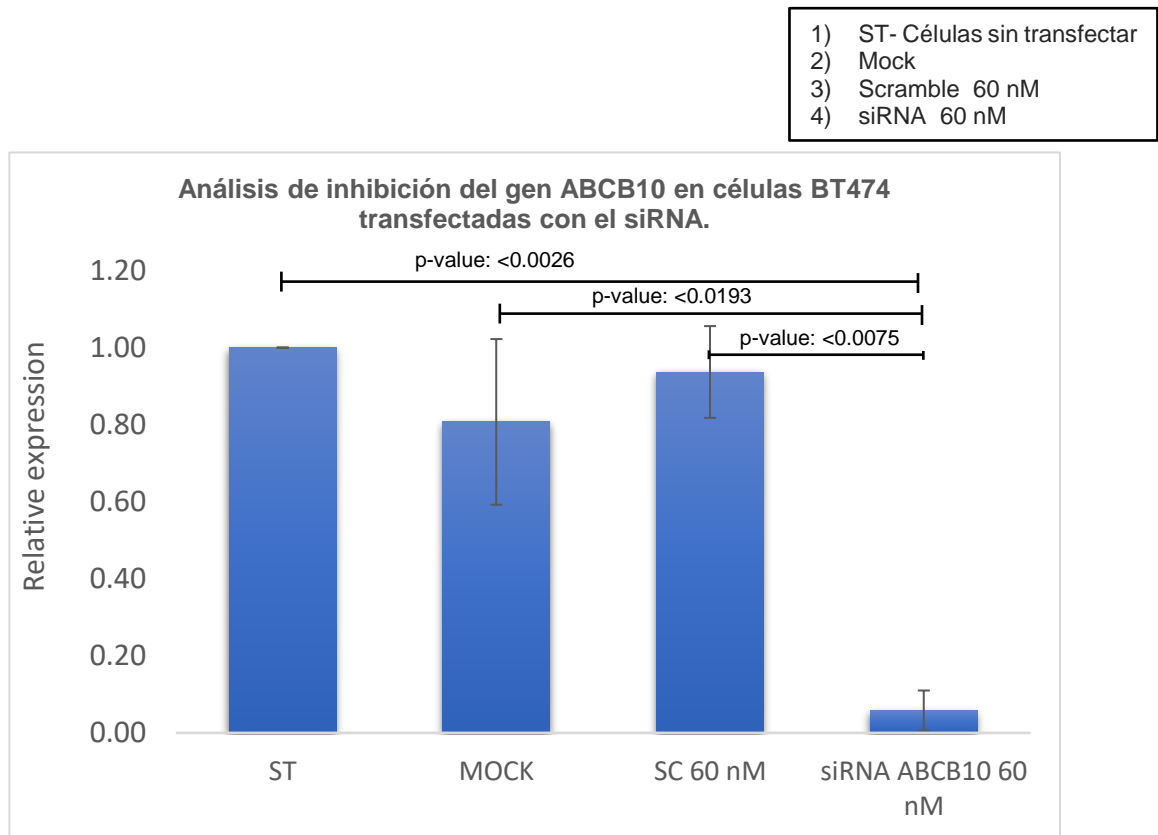
Al realizar el análisis de los datos obtenidos en la qRT-PCR, se confirmó que la expresión del gen ABCB10 estaba 4.5 veces más expresado en las células cultivadas en 3D vs las células cultivadas en 2D.



**Gráfica 11. Expresión diferencial del gen ABCB10 en células cultivadas en 2D y 3D.** El análisis de los datos de expresión del gen ABCB10 extraído de células cultivadas en 2D vs 3D, nos permitió confirmar que ABCB10 estaba sobreexpresado aproximadamente 4.9 veces más en 3D que en 2D. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores a  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 10.8 Análisis de inhibición del gen ABCB10 en células BT474

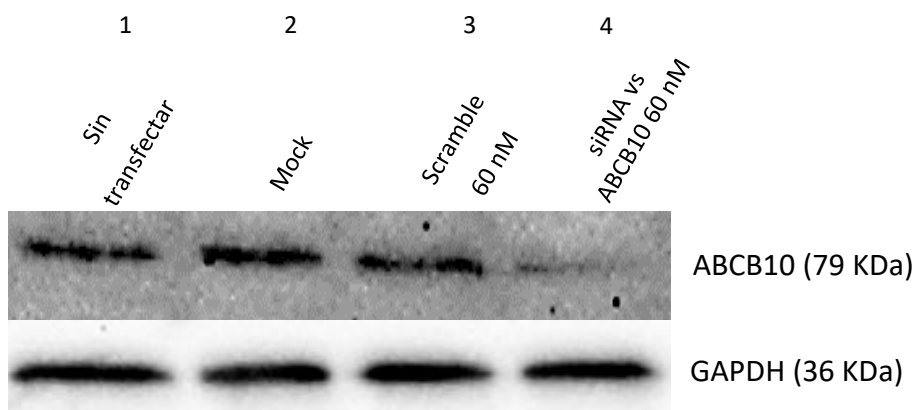
Los resultados del ensayo de silenciamiento de la expresión utilizando un siRNA exógeno, se evaluaron mediante qRT-PCR, para lo cual se realizó la extracción del RNA total de las células transfectadas, 48 horas posteriores a la transfección.



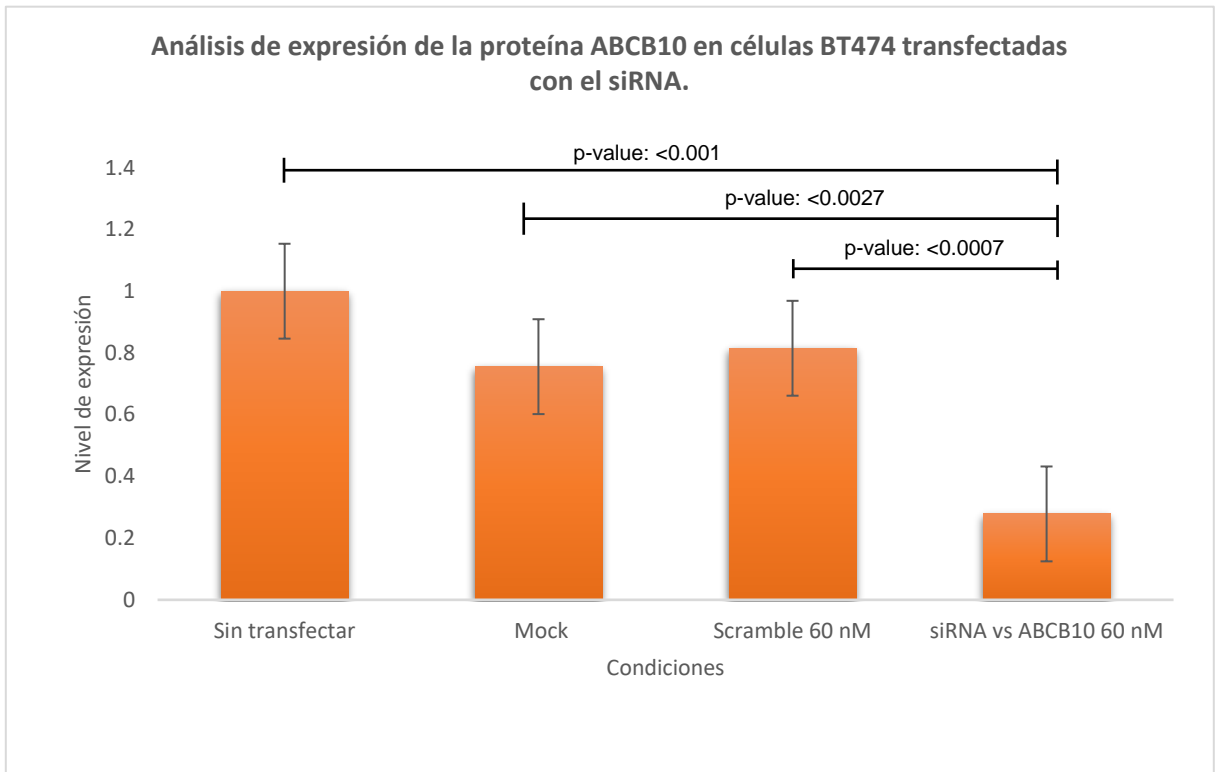
**Gráfica 12: Resultados del ensayo de inhibición del gen ABCB10 mediante qRT-PCR.** En la gráfica se muestran los resultados del ensayo de inhibición del gen ABCB10 con un siRNA específico se comprobó que el siRNA a una concentración de 60nM, disminuía la expresión del gen en aproximadamente 9 veces menos en comparación con las células que no fueron transfectadas. Se evaluaron las condiciones de células sin transfectar, mock y células transfectadas con la secuencia scramble. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores a  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 10.9 Análisis de inhibición de la proteína ABCB10 por Western Blot (WB)

De manera paralela se realizó un ensayo de WB para analizar la expresión del gen ABCB10 en células BT474 transfectadas con el siRNA específico para inhibir la expresión de la proteína ABCB10. Los resultados confirmaron lo previamente identificado en el ensayo por qRT-PCR, ya que se confirmó la inhibición de la expresión de la proteína ABCB10 en las células BT474 transfectadas con el siRNA específico para el gen ABCB10 a una concentración de 60 nM (fig. 24)



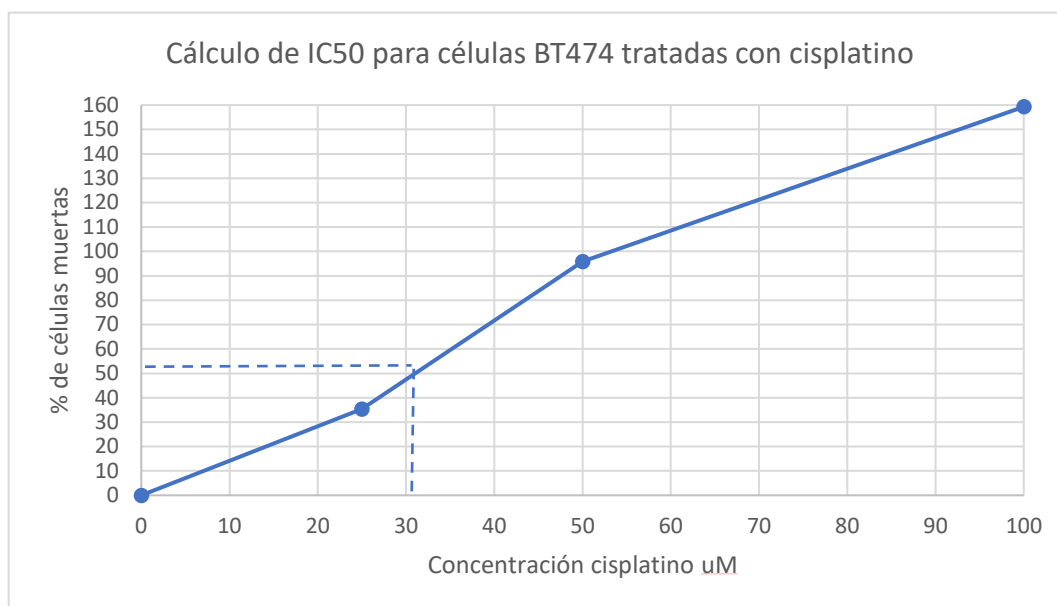
**Fig. 24 Resultados del ensayo de inhibición de la proteína ABCB10 mediante WB.** En la figura se muestra la inhibición de la expresión de la proteína ABCB10 en células BT474 sin transfectar (1), transfectadas con el mock (2), transfectadas con el scramble a 60 nM (3) y transfectadas con el siRNA para ABCB10 a 60 nM (4). Se observa una clara disminución de la expresión de la proteína ABCB10 en los extractos proteicos de las células BT474 transfectadas con el siRNA a 60 nM.



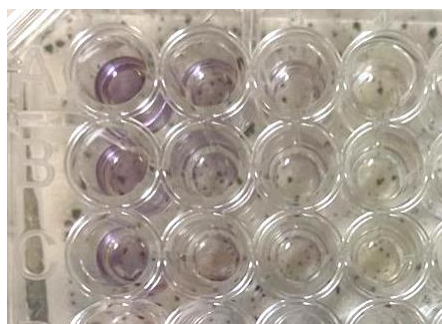
**Gráfica 13. Resultados del análisis densitométrico del ensayo de Western Blot (WB).** Se realizó un análisis densitométrico de las bandas identificadas en el ensayo de WB y se comprobó que la expresión de la proteína ABCB10 estaba disminuida aproximadamente 4 veces menos en comparación con la expresión de esta misma proteína, pero en células que no fueron transfectadas. La significancia estadística se determinó mediante la prueba *t de Student* y valores inferiores a  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 10.10 Ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las células BT474 tratadas con cisplatino.

Posteriormente se evaluó la viabilidad de las células usando el ensayo de MTT, y se calculo la IC50, que es la concentración de fármaco a la cual el 50% del cultivo se encuentra con viabilidad (gráfica 15). Se obtuvo que el valor de IC50 para la línea celular BT474 tratada con cisplatino fue de 30.09 $\mu$ M.



1      2      3      4

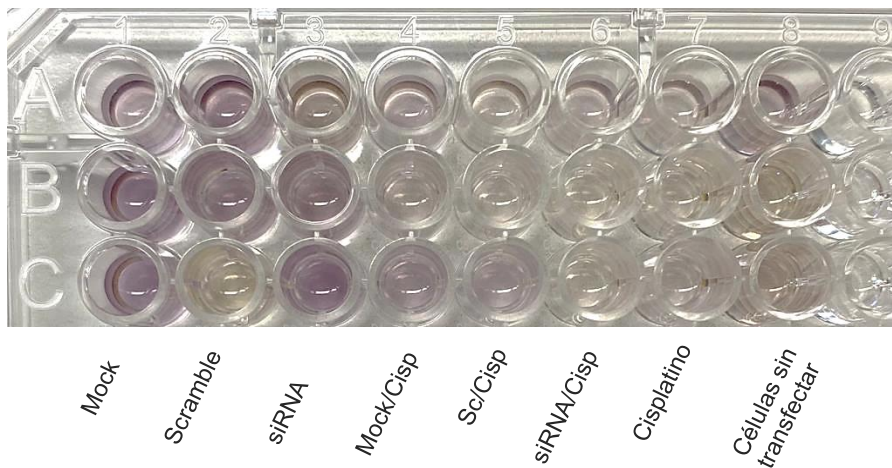
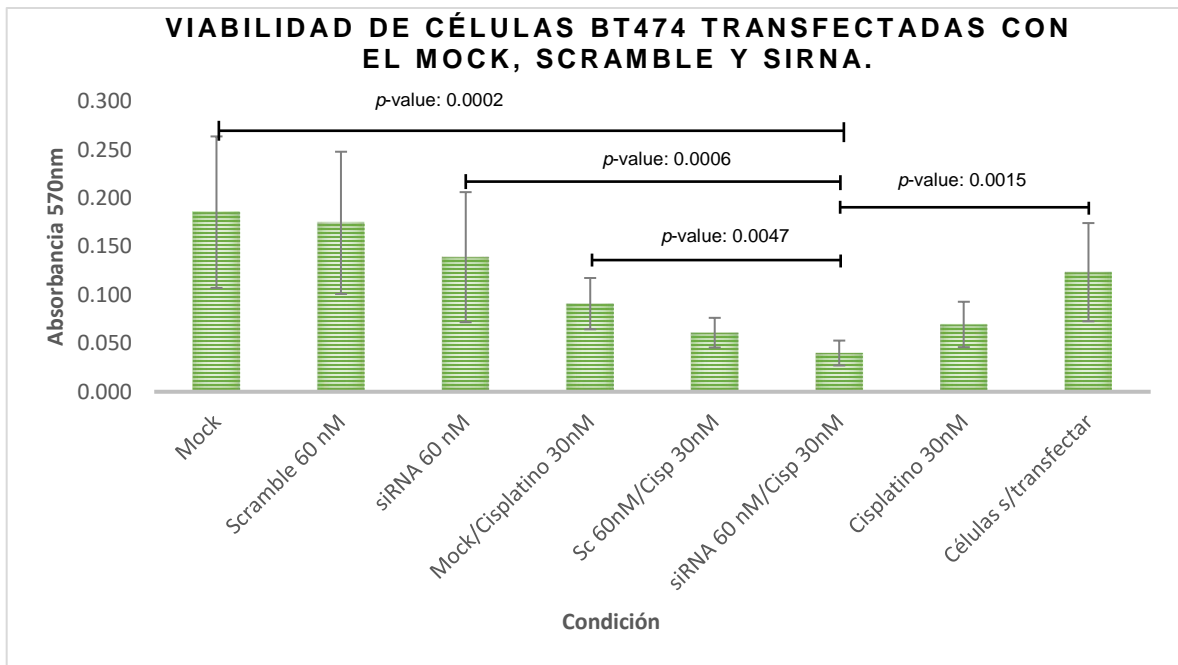


0  $\mu$ M      25  $\mu$ M      50  $\mu$ M      100  $\mu$ M

**Gráfica 14. IC50 de las células BT474 tratadas a diferentes concentraciones de cisplatino.** Se realizo un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de las células BT474 tratadas con cisplatino a diferentes concentraciones, se probaron 4 concentraciones del fármaco 0 $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Se comprobó que a una concentración de 30  $\mu$ M había una disminución del 50% de la viabilidad, por lo tanto fue la concentración que se uso para los análisis posteriores.

### **10.11 Determinación de la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA para el gen ABCB10**

Una vez teniendo los datos de la transfección del siRNA en las células BT474 por qRT-PCR, así como el resultado de la IC50 obtenido del ensayo de viabilidad por el ensayo de MTT; se procedió a evaluar la viabilidad de las BT474 transfectadas con el siRNA para el gen ABCB10, con la concentración adecuada de cisplatino, previamente obtenida. Los resultados de este ensayo se muestran en la gráfica 16 en dichos resultados confirmamos nuestra hipótesis, ya que las células que fueron transfectadas con el siRNA vs el gen ABCB10 disminuyeron su viabilidad vs las células transfectadas con el mock y con la secuencia scramble, así como con las células que únicamente fueron tratadas con cisplatino.



**Gráfica 16. Resultados del ensayo de MTT y qRT-PCR para evaluar la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA y tratadas con cisplatino.** Se realizó la transfección del siRNA específico para el gen ABCB10 en células BT474, pasadas 48 horas de la transfección se realizó el tratamiento con cisplatino por 48 horas. Los resultados se evaluaron con un ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las células, se comprobó que la viabilidad de las células que fueron transfectadas con el siRNA para ABCB10 y tratadas con cisplatino, disminuía en comparación con las células que no fueron transfectadas, pero si tratadas con cisplatino. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y valores inferiores a  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 11. DISCUSIÓN.

En las réplicas realizadas se comprobó el crecimiento en masa de las células BT474 lo que sugiere fuertes uniones célula- célula, a diferencia de los cultivos en monocapa en los cuales la morfología de las células no es uniforme. Asimismo, en este tipo de cultivos en monocapa se corroboró que las células crecen juntas formando parches, con una morfología alterada y una pérdida de la polaridad celular. Las diferencias en las condiciones de cultivo permitieron que, por ejemplo, en los cultivos en monocapa todas las células recibieran una cantidad homogénea de nutrientes y factores de crecimiento del medio durante el crecimiento. La monocapa está compuesta principalmente por células en proliferación, ya que las células necróticas generalmente se desprenden de las superficies y se eliminan fácilmente durante el cambio de medio. A diferencia de los esferoides cultivados en 3D, en los cuales se genera un gradiente al interior de estos tanto de nutrientes y oxígeno, como de los fármacos que usualmente son utilizados durante el tratamiento, imitando de esta forma un modelo más allegado a lo que sería un tumor *in-vivo*.

Posteriormente, para realizar el análisis morfológico de los esferoides, se utilizaron softwares especializados. Se hizo uso del software ImageJ, éste nos permitió calcular el diámetro de los esferoides formados el cual fue aumentando con el paso de los días, hasta alcanzar su máximo a los 5 días (120h). El diámetro máximo fue de 300  $\mu\text{m}$ , ya se ha reportado (Breslin, S. 2016) que las placas de cultivo utilizadas para realizar este tipo de cultivos son una limitante para el tamaño máximo alcanzado por los esferoideas, lo cual se pudo constatar de manera repetida en nuestros cultivos. De manera paralela se calculó el número de esferoides formados, para esto se utilizó el software CellProfiler que es un software especializado en imágenes de microscopía celular, que no requiere gran capacitación técnica, y nos proporciona entre otras cosas, el número de esferoides en un campo.

El mayor número de esferoides se detectó a las 24 horas posteriores a la siembra, posteriormente este número fue disminuyendo, pero el diámetro de los esferoides fue aumentando; la disminución en el número de esferoides se ha atribuido a una pérdida de la viabilidad celular en algunos esferoides, debido entre otros factores a que las zonas necróticas en la región central pueden tener un impacto en la proliferación de

las células más externas, así como a la disgregación de los esferoides de menor tamaño.

Para analizar los RNAm filtrados se procedió a ingresar nuestros sets a diferentes bases de datos de enriquecimiento, para evaluar que vías y procesos estaban enriquecidos tanto en los genes sobreexpresados como en los genes reprimidos. Las bases de datos que utilizamos fueron Enrichr, DAVID y FunRich, las cuales nos permitieron categorizar nuestros genes e identificar las vías biológicas enriquecidas.

En nuestros análisis *in-silico* pudimos comprobar que la hipoxia era una de las vías enriquecidas con los genes sobreexpresados en 3D, corroborando lo previamente reportado (Breslin, S., & O'Driscoll, L. 2016). Ya que se ha demostrado que la hipoxia generada en los esferoides cultivados en 3D promueve la expresión de genes asociados a la resistencia a terapia farmacológica (Nie, C. et. al. 2018). Lo cual se comprobó en nuestros análisis bioinformáticos (tabla 3).

Asimismo, se identificó que algunos de los genes sobreexpresados en 3D con respecto a 2D, asociados a resistencia terapia (tabla 3), también cumplían con un buen valor de AUC, y podían ser considerados como biomarcadores con potencial uso clínico (tabla 4). Entre estos se encontró al gen ABCB10, un miembro de la familia de transportadores dependientes de ATP tipo ABC. Implicados no sólo en la salida de fármacos sino también en el movimiento de nutrientes y otras moléculas biológicamente importantes hacia el interior, exterior y a través de las membranas plasmáticas y las membranas intracelulares de las células.

Posteriormente, se hizo uso de la plataforma ROC plotter, la cual nos permite vincular la expresión génica y la respuesta a la terapia utilizando datos a nivel transcriptómico de pacientes con cáncer de mama (ROCplot.org). La plataforma ROC también nos brinda un gráfico ROC, acrónimo de Receiver Operator Characteristic, que es una representación gráfica de la sensibilidad vs la especificidad. La diagonal o línea de no discriminación, divide el espacio ROC y nos proporciona el valor de área bajo la curva o AUC, los puntos por encima de la diagonal representan buenos resultados de clasificación, los puntos por debajo son resultados pobres (Anexos, fig. 2).

Los valores AUC muestran el poder pronostico del gen que se está evaluando.

➤ AUC = 0.6 Poco efecto de utilidad clínica.
➤ AUC = 0.6 a 0.7 Biomarcador en cáncer con potencial uso clínico.
➤ AUC > Biomarcador clínico en cáncer

Uno de los genes con un buen valor de AUC y una expresión aumentada en pacientes no respondedores vs respondedores (Anexos, fig. 1) así como en muestras de tejido tumoral vs muestras normales (Anexos, fig. 3), fue el transportador ABCB10, el cual es uno de los 3 transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias y que, entre otras funciones, cataliza la exportación de sustratos fisiológicos desde la matriz mitocondrial al citosol de manera dependiente de ATP. Esta proteína es miembro de la subfamilia MDR/TAP involucrados en la resistencia a múltiples fármacos (Lage, H. 2003).

Ya se ha reportado el papel de algunos transportadores tipo ABC en el movimiento de diferentes moléculas orgánicas y fármacos a través de membranas, así como en el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Lage, 2003). Sin embargo, el papel del transportador ABCB10 no se ha reportado como tal en este tipo de mecanismo, nosotros comprobamos que su inhibición promueve la sensibilización de las células BT474 al tratamiento con cisplatino (gráfica 15).

Para corroborar la sobreexpresión del gen ABCB10 identificada en nuestro ensayo de microarreglo, se llevo a cabo una qRT-PCR y un WB para analizar la expresión del gen ABCB10 a nivel de RNAm y de proteína, tanto en 3D como en 2D, los resultados de estos ensayos corroboraron lo que previamente habíamos identificados en nuestro microarreglo, ya que la expresión del gen ABCB10 fue aproximadamente 4.9 veces mayor en cultivos 3D que en 2D (tabla 5). Con este resultado también se confirma que en las células cultivadas en 3D hay una mayor expresión de genes asociados a resistencia a terapia farmacológica.

Posteriormente, inhibimos la expresión del gen ABCB10 en las células BT474 utilizando un siRNA específico para este gen. Esto con el fin de sensibilizar el cultivo al tratamiento con cisplatino, los resultados del este experimento mostraron que las células transfectadas con el siRNA a una concentración de 60 nM se volvían más sensibles al tratamiento con cisplatino en comparación con las células que no fueron transfectadas o con las que fueron transfectadas con una secuencia scramble,

comprobando que la inhibición de la expresión del gen ABCB10 tiene un impacto en la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino.

Los datos obtenidos y posteriormente analizados, mostraron que las células que fueron transfectadas con el siRNA vs el gen ABCB10 disminuyeron su viabilidad vs las células transfectadas con el mock y con la secuencia scramble, así como con las células que únicamente fueron tratadas con cisplatino (gráfica 15). Aunque el gen ABCB10 no está identificado como un gen asociado a MDR, nuestros resultados mostraron que su inhibición en células BT474 cultivadas en monocapa, presentan una mayor sensibilidad al tratamiento farmacológico.

## 12. CONCLUSIONES.

1. Se comprobó que las células BT474 cultivadas en 3D crecen con una morfología en masa, asimismo, exhiben características morfológicas similares a los tumores en condiciones *in-vivo*, y por lo tanto se espera que su perfil de expresión sea más allegado al de éstos
2. Al realizar el análisis de los resultados del microarreglo se pudo confirmar que las condiciones de cultivo en 3D de la línea celular BT474, genera una expresión diferencial de genes, promoviendo la sobreexpresión de genes asociados a resistencia a terapia (ABCB10, ESR1, CCT6B).
3. Los análisis bioinformáticos, nos permitieron comprobar que la vía de hipoxia, promovida por los bajos niveles de oxígeno, promueve la expresión de genes asociados a resistencia a terapia, los cuales pueden estar favoreciendo la tumorigénesis.
4. Se corroboró la sobreexpresión del gen ABCB10, identificada en nuestro ensayo de microarreglos, mediante qRT-PCR y WB en cultivos en 3D vs cultivos en 2D, cabe resaltar que en los cultivos 3D, los esferoides formados presentan en sus capas más internas condiciones hipóxicas, así como de privación de nutrientes, y por lo tanto pueden estar favoreciendo la expresión de transportadores.
5. Se comprobó que la viabilidad de las células BT474 transfectadas con el siRNA para ABCB10 y tratadas con cisplatino a 30  $\mu$ M, se volvían más sensibles al tratamiento con cisplatino en comparación con las que no eran transfectadas.

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aisenbrey, E. A., & Murphy, W. L. (2020). Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature reviews. Materials*, 5(7), 539–551. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>
2. Bergamaschi, A., Tagliabue, E., Sørli, T., Naume, B., Triulzi, T., Orlandi, R., Russnes, H. G., Nesland, J. M., Tammi, R., Auvinen, P., Kosma, V. M., Ménard, S., & Børresen-Dale, A. L. (2008). Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *The Journal of pathology*, 214(3), 357–367. <https://doi.org/10.1002/path.2278>
3. Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, 7(29), 45745–45756. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9935>
4. Burrell, R. A., Juul, N., Johnston, S. R., Reis-Filho, J. S., Szallasi, Z., & Swanton, C. (2010). Targeting chromosomal instability and tumour heterogeneity in HER2-positive breast cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 111(4), 782–790. <https://doi.org/10.1002/jcb.22781>
5. Cancer-Its various types along with causes, symptoms, treatments and stages, in: cancer info guide, 2009. <http://www.cancer-info-guide.com/>
6. Candenedo-González, F; Pérez-Salazar, E. (2012). El papel de la progesterona en cáncer de mama. *Rev. GAMO*. Vol. 11. Núm. 3, mayo- junio 2012. México.
7. Coleman MP et al. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*, 9, 730–56. Tomado de: Organización Mundial de la Salud (OMS). *Cáncer de mama: prevención y control. Carga de cáncer de mama. Año. 2017*. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
8. Dutta, R. Dutta, A. (2018). ECM mimicking for 3d cell culture. En *3D Cell Culture Fundamentals and applications in tissue engineering and regenerative medicine* (118-129). Singapore: Pan Stanford.
9. Dzobo, K., Rowe, A., Senthebane, D. A., AlMazyadi, M. A. M., Patten, V., & Parker, M. I. (2018). Three-Dimensional Organoids in Cancer Research: The

- Search for the Holy Grail of Preclinical Cancer Modeling. *Omics : a journal of integrative biology*, 22(12), 733–748. <https://doi.org/10.1089/omi.2018.0172>
10. Ewis, A. A., Zhelev, Z., Bakalova, R., Fukuoka, S., Shinohara, Y., Ishikawa, M., & Baba, Y. (2005). A history of microarrays in biomedicine. Expert review of molecular diagnostics, 5(3), 315–328. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.3.315>
  11. Gangadhara, S., Smith, C., Barrett-Lee, P., & Hiscox, S. (2016). 3D culture of Her2+ breast cancer cells promotes AKT to MAPK switching and a loss of therapeutic response. *BMC cancer*, 16, 345. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2377-z>
  12. Garza, S. Juárez, S. (2014) *El cáncer*. Universidad Autónoma de Nuevo León UANL. Monterrey. México.
  13. GeneOntolgy Unifying biology. Copyright © 1999-2023 Member of the [Open Biological Ontologies Foundry](#) The GO Consortium is funded by the National Human Genome Research Institute (US National Institutes of Health), grant number [HG012212](#), with co-funding by NIGMS. Consultado el: 28 de enero de 2023.
  14. Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Wigfield, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., Gandolfi, V., Dogliotti, L., Bottini, A., Harris, A. L., & Fox, S. B. (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(15), 4562–4568. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2690>
  15. Gottesman M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. Annual review of medicine, 53, 615–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>
  16. Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(1), 55–62. <https://doi.org/10.5858/2010-0454-RAR.1>
  17. Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik,

- S., Perlmutter, J., Rhodes, A., ... College of American Pathologists (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of pathology & laboratory medicine*, 134(7), e48–e72. <https://doi.org/10.5858/134.7.e48>
18. Hu, M., & Polyak, K. (2008). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 44(18), 2760–2765. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.038>
19. International Agency for Research on Cancer (2023). World Health Organization. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Recuperado el 22 de enero de 2023 en: <http://gco.iarc.fr/>.
20. Irigoyen, M. A., García, F. V., Iturriagagoitia, A. C., Beroiz, B. I., Martínez, M. S., & Guillén Grima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 34(2), 219–233. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272011000200008>
21. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V. ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
22. Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., Lorenz, K., Lee, E. H., Barcellos-Hoff, M. H., Petersen, O. W., Gray, J. W., & Bissell, M. J. (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. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>
23. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

24. Lage H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents*, 22(3), 188–199. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00203-6](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00203-6)
25. Lage H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents*, 22(3), 188–199. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00203-6](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00203-6)
26. Lee, Y. J., Won, A. J., Lee, J., Jung, J. H., Yoon, S., Lee, B. M., & Kim, H. S. (2012). Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *International journal of medical sciences*, 9(10), 881–893. <https://doi.org/10.7150/ijms.5011>
27. León, L. (2019). Cultivo en suspensión de células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo para terapia celular. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Departamento de ingeniería química, biotecnología y materiales. Universidad de Chile. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/173310/Cultivo-en-suspensi%C3%B3n-de-c%C3%A9lulas-mesenquimales-obtenidas-de-tejido-adiposo-para-terapia-celular.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. Li, Q., Chow, A. B., & Mattingly, R. R. (2010). Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 332(3), 821–828. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160390>
29. Loewe, R. P., & Nelson, P. J. (2011). Microarray bioinformatics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 671, 295–320. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-551-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-551-0_18)
30. Lomanto, D; Ortiz, C; Bretón, P; Gómez, L; Mesa, C. (2003). El ciclo celular. Med UNAB. Vol. 6 Número 16 - Mayo de 2003. Universidad Autónoma de Bucaramanga, Calle 157 # 55-19, Cañaveral Parque, Bucaramanga, Colombia.
31. Lqbal, N. y Iqbal, N. (2014). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular biology international*, 2014 , 852748. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>

32. Lumachi, F., Santeufemia, D. A., & Basso, S. M. (2015). Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World journal of biological chemistry*, 6(3), 231–239. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.231>
33. McAleese, C. E., Choudhury, C., Butcher, N. J., & Minchin, R. F. (2021). Hypoxia-mediated drug resistance in breast cancers. *Cancer letters*, 502, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.045>
34. Mitri, Z., Constantine, T. y O'Regan, R. (2012). The HER2 receptor in breast cancer: Pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemotherapy research and practice*. 2012 , 743193. <https://doi.org/10.1155/2012/743193>
35. Mueller, D., Krämer, L., Hoffmann, E., Klein, S., & Noor, F. (2014). 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 28(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.024>
36. Nelson, C. M., & 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>
37. Nie, C., Lv, H., Bie, L., Hou, H., & Chen, X. (2018). Hypoxia-inducible factor 1-alpha expression correlates with response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *Medicine*, 97(51), e13551. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013551>
38. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Cáncer de mama: prevención y control. Carga de cáncer de mama. Año. 2017*. Recuperado el 22 de enero de 2023. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
39. Organización Mundial de la Salud, (OMS). *Constitución y Estatutos, documentos básicos*. 48.<sup>a</sup> ed. Año 2014. Ginebra. Consultado el 8 de marzo de 2021. disponible en <http://apps.who.int/gb/bd/s/>
40. Parise, C. A., & Caggiano, V. (2014). Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor

- Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of cancer epidemiology*, 2014, 469251. <https://doi.org/10.1155/2014/469251>
41. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
42. Quezada, R. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS* 65, 5–12 (2007). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
43. Ramaiahgari, S. C., den Braver, M. W., Herpers, B., Terpstra, V., Commandeur, J. N., van de Water, B., & Price, L. S. (2014). A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Archives of toxicology*, 88(5), 1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1215-9>
44. Ramaiahgari, S. C., den Braver, M. W., Herpers, B., Terpstra, V., Commandeur, J. N., van de Water, B., & Price, L. S. (2014). A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Archives of toxicology*, 88(5), 1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1215-9>
45. Renoir, J. M., Marsaud, V., & Lazennec, G. (2013). Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 85(4), 449–465. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.018>
46. Rivar, A; Galarza-Paez, L; Peterson, D. (2023). Anatomy, Thorax, Breast. StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519575/>
47. Roulot, A., Héquet, D., Guinebretière, J. M., Vincent-Salomon, A., Lerebours, F., Dubot, C., & Rouzier, R. (2016). Tumoral heterogeneity of breast cancer. Hétérogénéité tumorale des cancers du sein. *Annales de biologie clinique*, 74(6), 653–660. <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1192>

48. Rueff, J., & Rodrigues, A. S. (2016). Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1395, 1–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3347-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3347-1_1)
49. Salinas-Vera, Y. M., Valdés, J., Pérez-Navarro, Y., Mandujano-Lazaro, G., Marchat, L. A., Ramos-Payán, R., Nuñez-Olvera, S. I., Pérez-Plascencia, C., & López-Camarillo, C. (2022). Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Frontiers in oncology*, 12, 826113. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.826113>
50. Secretaría de Salud (SSa). *Compendio de patología mamaria*. Dirección General de Salud Reproductiva. 1<sup>a</sup> ed. Año. 2015. México.
51. Sena, J. A., Wang, L., Heasley, L. E., & Hu, C. J. (2014). Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes. *Molecular cancer research : MCR*, 12(9), 1233–1243. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0149>
52. Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., & Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature medicine*, 5(6), 662–668. <https://doi.org/10.1038/9511>
53. Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(1), 109-126. <https://www.japtr.org/article.asp?issn=22314040;year=2010;volume=1;issue=2;spage=109;epage=126;aulast=Sharma;type=0>
54. Shirihai, O. S., Gregory, T., Yu, C., Orkin, S. H., & Weiss, M. J. (2000). ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *The EMBO journal*, 19(11), 2492–2502. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2492>
55. Smith, L; Greenfield, Andy. (2003). DNA microarrays and development, *Human Molecular Genetics* , Volumen 12, Edición suppl\_1, 2 de abril de 2003, Páginas R1 – R8.
56. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P.

- E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8418–8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
57. Srikant, S., & Gaudet, R. (2019). Mechanics and pharmacology of substrate selection and transport by eukaryotic ABC exporters. *Nature structural & molecular biology*, 26(9), 792–801. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0280-4>
58. Sung, H , Ferlay, J , Siegel, RL , Laversanne, M , Soerjomataram, I , Jemal, A , Bray, F Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* . 2020 . <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
59. Tang, Z. et al. (2019) GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res*, 10.1093/nar/gkz430.
60. Wandersman, C. (1998). Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Research in Microbiology*, Volume 149, Issue 3, 1998, Pages 163-170, ISSN 0923-2508, [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(98\)80076-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(98)80076-4).
61. Zerecero, O; Valle, A; Weiss, B y Soto, I. (2012). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su relación con el cáncer. © VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 15(1), 15-25. 2012.

## 14. ANEXOS.

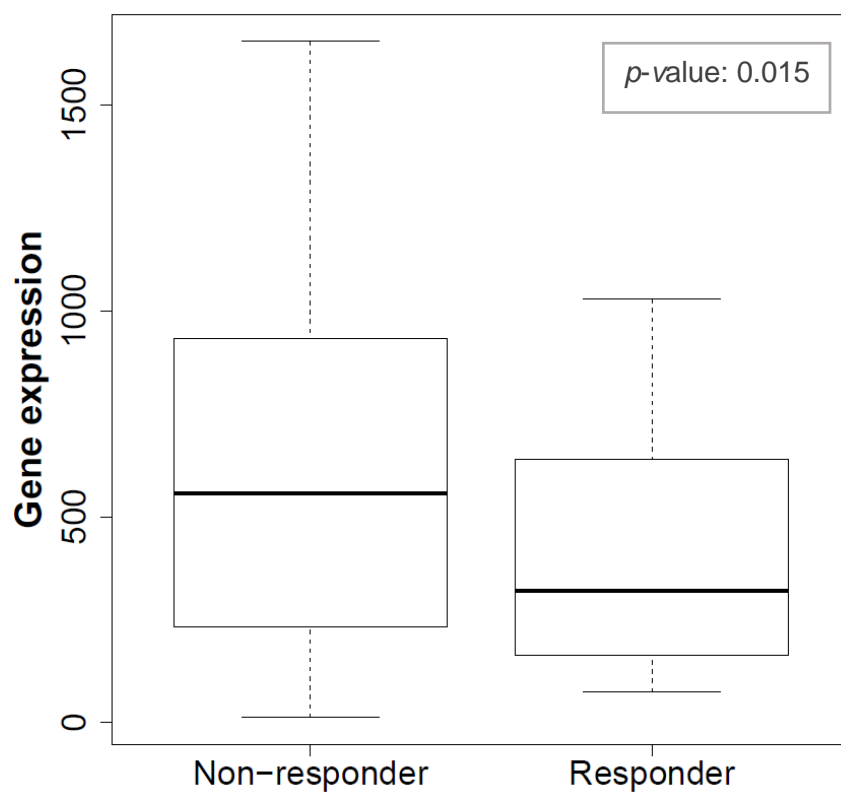


Figura 1. .Plot de expresión del gen ABCB10 en pacientes respondedores vs NO respondedores a terapia.

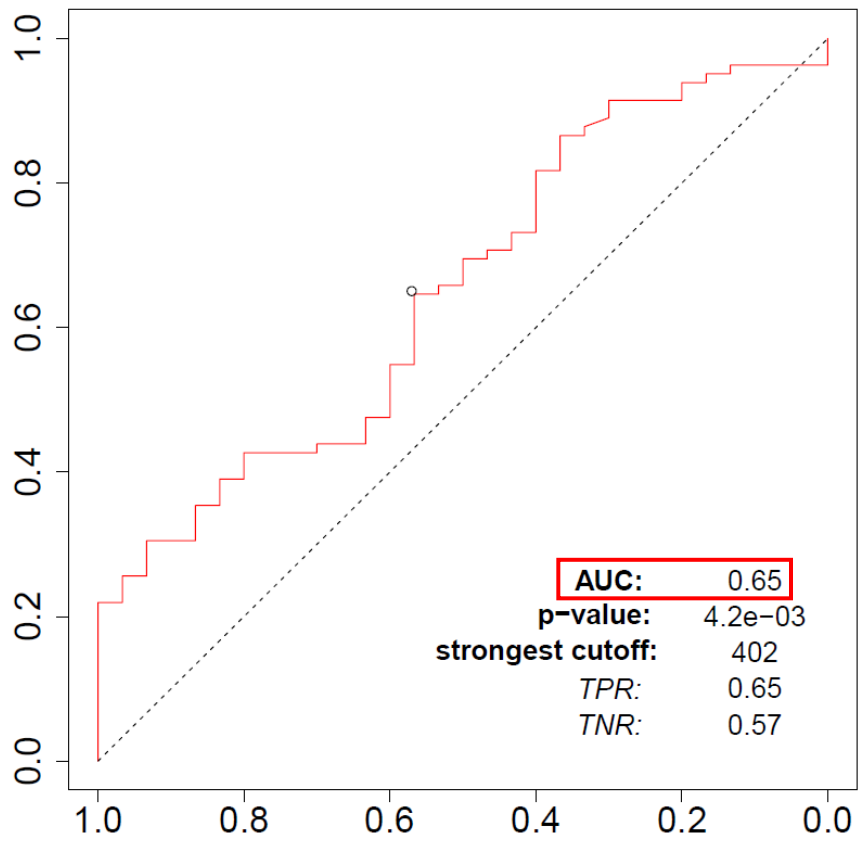


Figura 2. Gráfico ROC del gen ABCB10.

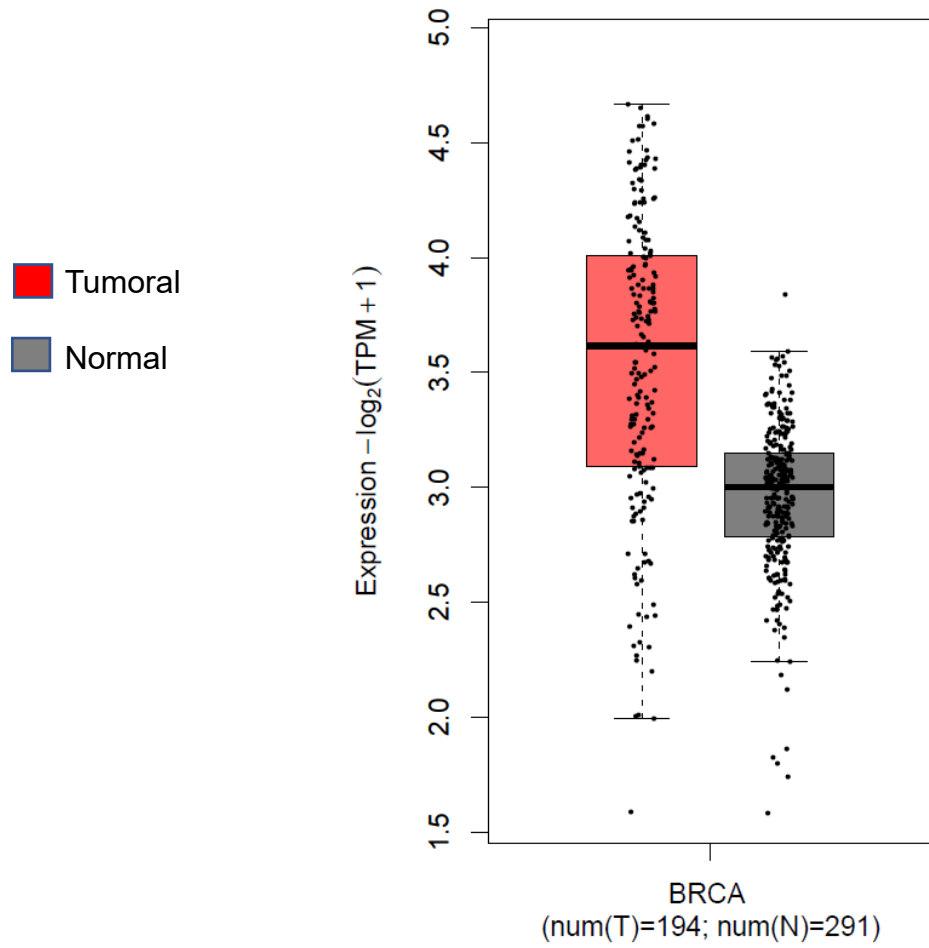


Figura 3. Plot de expresión del gen ABCB10 en muestras de tejido tumoral de mama vs tejido no tumoral de mama.