

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 DE CIENCIAS GENÓMICAS

**DETERMINACIÓN DEL IMPACTO DEL CRECIMIENTO
DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA EN CULTIVOS
EN 3D ORGANOTÍPICOS SOBRE EL PERFIL DE
METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y SU EFECTO EN
LA INVASIÓN Y METÁSTASIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO/A EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

ALMA JAQUELINE HEREDIA MENDEZ

DIRECTOR

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

CODIRECTOR

DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, Junio, 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.

JURADO ASIGNADO

COMITÉ DE CERTIFICACIÓN:

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez (UACM)

Secretario: Dr. Mario César López Camarillo (UACM)

Vocal: Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia (UNAM)

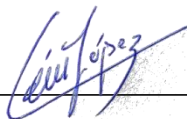
1er. Suplente: Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz (UACM)

2do. Suplente: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy (UACM)

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR



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

CODIRECTOR



Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia
Facultad de Estudios Superiores de Iztacala de la UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia por aceptar tomar la codirección de este trabajo y apoyarlo en todo momento. A la Dra. Elizabeth Álvarez por su apoyo y compromiso con este trabajo. Agradezco infinitamente a la Dra. María Cecilia Zampedri por siempre estar al pendiente del proyecto, guiarme y poner todo su entusiasmo en este mismo.

Agradezco el apoyo económico que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me permitió realizar satisfactoriamente mis estudios de maestría.

Hago un agradecimiento especial al Dr. Jorge Meléndez Zajgla director general del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por abrirme las puertas de su laboratorio, a todo su equipo del laboratorio de genómica funcional del cáncer por siempre acogerme y a la Dra. Gisela Ceballos por su apoyo y guía en técnicas metodológicas.

Agradezco al Dr. José Manuel Sánchez por su guía, apoyo y mentoría.

Agradezco al Dr. José Benjamín Bustamante por siempre apoyarme y orientarme.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio 02 del posgrado en ciencias genómicas: Fernando, Martha, Paola por brindarme su apoyo y soporte.

Gracias a los profesores, secretarias y cada una de las personas que integran el posgrado en ciencias genómicas de la UACM por seguir formándome en el camino de la ciencia.

Gracias a la Dra. Martha Yocupicio y a la Dra. Ángeles Tecalco por aceptar ser mis lectoras y por su apoyo.

Y por último agradezco al director de este proyecto el Dr. César López Camarillo por aceptarme en su laboratorio.

DEDICATORIA

A mis amados padres que son el soporte de mi vida, a mis abuelos que aunque no están para verlo, los llevo siempre presentes, a mi familia por estar siempre ahí conmigo y al amor de mis días porque nunca quiero recurrir al marcapasos.

ÍNDICE

Abreviaturas	11
Resumen.....	17
Abstract	18
1 Introducción	19
1.1 Cáncer.....	19
1.2 Cáncer de mama.....	20
1.2.1 Epidemiología	21
1.2.2 Factores de riesgo	23
1.2.3 Clasificación histológica	23
1.2.4 Clasificación molecular	24
1.3 Hallmarks del cáncer	25
1.3.1 Invasión y metástasis en cáncer de mama	26
1.3.1.1 Invasión local y modificación del citoesqueleto	28
1.3.1.2 Transformación de la MEC	29
1.3.1.3 La transición epitelial a mesenquimal.....	29
1.3.1.4 Intravasación.....	31
1.3.1.5 Extravasación y colonización	32
1.3.2 Organotropismo metastásico	32
2. Antecedentes particulares.....	34
2.1 El epigenoma	34
2.1.1 Metilación del ADN	35
2.1.1.1 Escritores, lectores y borradores de marcas de metilación de ADN ...	36
2.1.2 Metilación aberrante del ADN.....	38
2.1.3 Metilación aberrante en cáncer de mama	39
2.2 Cultivos celulares organotípicos en tres dimensiones (3D)	42
2.2.1 Tipos de morfología de cultivos en 3D	43
2.3 Modelos de xenotransplantes de cáncer	45
3. Justificación	47
4. Hipótesis.....	48
5. Objetivos	48
5.1 Objetivo general	48
5.2 Objetivos particulares	48
6. Estrategia experimental	49

7.	Materiales y métodos.....	50
7.1	Establecimiento de cultivos de líneas celulares en 2D.....	50
7.2	Establecimiento de los cultivos organotípicos 3D en Matrigel	51
7.2.1	Tinción fluorescente de células	51
7.3	Evaluación la capacidad de invasión y metástasis in vivo de células de cáncer de mama cultivadas en 3D y 2D.....	52
7.3.1	Mantenimiento general de los peces cebra	52
7.3.2	Metodología de xenotrasplantes.....	53
7.4	Análisis del estado de metilación de 850 000 sitios CpG individuales a través del genoma de las células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D	54
7.4.1	Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	54
7.4.2	Cuantificación y análisis de la integridad del ADN genómico obtenido a partir de cultivos celulares en 2D y 3D	55
7.4.3	Análisis del estado de metilación de sitios CpG individuales a través del genoma con microarreglos de metilación.....	56
7.4.4	Validación del microarreglo de metilación.....	57
7.4.4.1	Diseño de oligonucleótidos para sitios CpG en promotores.....	57
7.4.4.2	Conversión del ADN genómico con bisulfito de sodio	58
7.4.4.3	PCR en punto final para amplificación de sitios metilados	59
7.5	Análisis de enriquecimiento de vías	60
7.6	Selección de un gen modulado epigenéticamente como propuesta para su análisis funcional	61
8.	Resultados	62
8.1	Establecimiento de cultivos celulares en 2D y 3D.....	62
8.2	Análisis de capacidad de invasión y migración <i>in vivo</i> en un modelo de xenotrasplantes	63
8.2.1	Línea celular Hs-578-T.....	64
7.2.2	Línea celular BT-474.....	65
7.2.3	Línea celular SK-BR-3	66
66		
7.3	Análisis del estado de metilación de 866 895 sitios CpG individuales a través del genoma de las células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D.	68
7.3.1	Cuantificación, análisis de la integridad y pureza de ADN genómico extraído de células cultivadas en 2D y 3D	68
7.3.2	Gráficos de densidad del estado de metilación de regiones analizadas con el microarreglo Infinium MethylationEPIC BeadChip de la compañía Illumina.....	70
7.3.3	Análisis diferencial del nivel de metilación del ADN genómico entre los grupos experimentales.	71

7.3.4	Validación del microarreglo de metilación.....	72
7.4	El método de cultivo en 3D induce cambios en el perfil de metilación de las células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3.....	73
7.5	Descripción general de los genes módulos de manera epigenética por metilación del ADN entre las líneas células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3.	76
	Línea celular Hs-578-T	76
	Línea celular BT-474	78
	Línea celular SK-BR-3.....	80
7.6	Selección de un gen modulado epigenéticamente como propuesta para análisis funcional	82
9.	Discusión	85
10.	Conclusiones.....	90
11.	Perspectivas.....	91
12.	Bibliografía	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	24
Tabla 2. Programa de PCR para la conversión de ADN con bisulfito de sodio	58
Tabla 3. Componentes de las reacciones preparadas para PCR en punto final de validación del microarreglo.	59
Tabla 4. Programa para amplificación de ADN convertido con bisulfito de sodio para la validación de microarreglo de metilación.	60
Tabla 5. Cuantificación por nanodrop del ADN genómico de las células SK-BR-3, Hs-578-T y BT-474 cultivadas en 2D.....	68
Tabla 6. Cuantificación por nanodrop del ADN genómico de las células SK-BR-3, Hs-578-T y BT-474 cultivadas en 3D.....	69
Tabla 7. Gráficos de densidad para todas las líneas celulares de estudio.	70
Tabla 8. Geles de agarosa al 1.7% para verificar el tamaño del amplicón después de la PCR con bisulfito de sodio.	73
Tabla 9. Genes hipermetilados que se comparte entre las líneas celulares de estudio.	82
Tabla 10. Genes hipometilados que se comparte entre las líneas celulares de estudio	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la mama femenina: imagen tomada de Publicación de la Sociedad Americana Contra el Cáncer (American Cancer Society, ACS) 2019.	20
Figura 2. Nuevos casos de cáncer en la mujer a nivel mundial: GLOBOCAN 2020.22	
Figura 3. Características distintivas del cáncer (Hanahan 2022).	26
Figura 4. Representación de la cascada metastásica en cáncer de mama. Figura realizada en Biorender.	27
Figura 5. Resumen de las metástasis organotrópicas del cáncer de mama. Imagen extraída y modificada de Neophytou et al., 2018 y Chen et al., 2020.	33
Figura 6. Representación de las islas CpG, shores y shelves en una secuencia en el genoma (Clausen 2020).....	36
Figura 7. Escritores y borradores de la metilación del ADN. Figura realizada en Biorender.	37
Figura 8. Representación de los mecanismos de silenciamiento génico por metilación del ADN. Figura realizada en Biorender.....	38
Figura 9. Modelo propuesto de regulación epigenética en el cáncer de mama. Imagen tomada y modificada de Katz., et al 2014.	41
Figura 10. Comparación del cultivo en monocapas y cultivo en 3D (Fontana et al., 2020).....	42
Figura 11. Las morfologías de colonias de líneas celulares de mama en cultivo 3D. Imagen tomada y modificada de Kenny et al., 2007.	44
Figura 12. Morfología de las líneas celulares Hs-578T, BT-474 y SK-BR-3 en cultivo 2D y cultivos celulares 3D observados en microscopía óptica (20x y 40x).	62
Figura 13. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular Hs-578-T. .	64
Figura 14. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular BT-474.	65
Figura 15. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular SK-BR-3...66	

Figura 16. Volcano plot que ilustra los 1391 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular Hs-578-T: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.....	71
Figura 17. Volcano plot que ilustra los 1512 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular SK-BR-3: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.....	72
Figura 18. Volcano plot que ilustra los 2078 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular BT-474: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.....	72
Figura 19. Agrupamiento de los genes diferencialmente metilados: en azul están los genes hipometilados, en rojo genes hipermetilados y en amarillo genes con metilación diferente según la línea celular.	74
Figura 20. Diagrama de Venn que resume la agrupación para cada línea celular del número de sitios hipometilado, hipermetilado y con perfil de metilación diferente.	75
Figura 21. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células Hs-578-T. El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor de enriquecimiento en el eje X.....	76
Figura 22. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO de la línea celular Hs-578-T. El tamaño de la burbuja indica el número relativo de genes en el conjunto. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.	77
Figura 23. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes diferencialmente metilados para células Hs-578-T. Cada círculo representa un gen y el tamaño indica el número relacionado de genes. El color de cada cuerda representa una de las 10 mejores rutas enriquecidas. El color de la burbuja indica el valor de cambio o FC donde los rojos están más metilados y los azules están menos metilados.....	77
Figura 24. Rutas específicas para células Hs-578-T. Los genes de color se ven afectados por la metilación del ADN. Los genes de color rojo están hipermetilados y los genes de color verde están hipometilados, este diagrama se obtuvo con el software de uso libre Enrichr.....	78
Figura 25. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células BT-474 El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor d enriquecimiento en el eje de las X.....	78
Figura 26. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO para la línea celular BT-474. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.	79
Figura 27. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes diferencialmente metilados para células BT-474. Cada círculo representa un gen y el tamaño indica el número relacionado de genes. El color de cada cuerda representa una de las 10 mejores rutas enriquecidas. El color de la burbuja indica el valor de cambio o FC donde los rojos están más metilados y los azules están menos metilados.....	79
Figura 28. Rutas específicas para células BT-474. Los genes de color se ven afectados por la metilación del ADN, donde los genes de color rojo están hipermetilados y los genes de color verde están hipometilados, este diagrama se obtuvo con el software de uso libre Enrichr.	80
Figura 29. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a	

sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células SK-BR-3 El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor de enriquecimiento en el eje de las X.....	80
Figura 30. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO para la línea celular SK-BR-3. El tamaño de la burbuja indica el número relativo de genes en el conjunto. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.	81
Figura 31. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes diferencialmente metilados para células SK-BR-3. Cada círculo representa un gen y el tamaño indica el número relacionado de genes. El color de cada cuerda representa una de las 10 mejores rutas enriquecidas. El color de la burbuja indica el valor de cambio o FC donde los rojos están más metilados y los azules están menos metilados.....	81
Figura 32. Rutas específicas para células SK-BR-3. Los genes de color se ven afectados por la metilación del ADN, donde los genes de color rojo están hipermetilados y los genes de color verde están hipometilados, este diagrama se obtuvo con el software de uso libre Enrichr.	82
Figura 33. Identificación de Islas CpG en el promotor de USP44.	84
Figura 34. Nivel de expresión de USP44 para los subtipos de cáncer de mama usando muestras de pacientes con cáncer de mama de la base de datos de TCGA: comparación de la expresión de ARNm de USP44 entre muestras normales y de cáncer de mama.	85

Abreviaturas

ADN: ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.

AGR2: PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA DE GRADIENTE ANTERIOR 2.

Alu: SECUENCIAS DE ADN REPETIDAS.

ANG2: ANGIOPOYETINA 2.

APC: PROTEINA POLIPOSIS COLI ADENOMATOSA.

ARN: ÁCIDO RIBUNUCLEICO.

ARP2/3: PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ACTINA.

ATF: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ACTIVADORES.

ATM: GEN ATAXIA TELANGIECTASIA MUTADO.

BCL-2: B-CELL LYMPHOMA 2, PROTEINA REGULADORA DE APOPTOSIS.

BCR: ACTIVADOR BCR DE RHOGEF Y GTPASA.

BRCA 1: BREAST CANCER 1, GEN SUPRESOR TUMORAL.

BRCA 2: BREAST CANCER 2, GEN SUPRESOR TUMORAL.

BRMS1: REPRESOR TRANSCRIPCIONAL Y REGULADOR ANOIKIS.

BT-474: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA TIPO LUMINAL B.

CAF: FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR.

CD44: GLICOPROTEINA TRANSMEMBRANA IMPLICADA EN LA ADHESIÓN ENTRE CÉLULAS Y DIFERENTES COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

CD47: PROTEÍNA ASOCIADA A INTEGRINA.

CD133: GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANA PERTENECIENTE A LA FAMILIA DE LA PROMININA.

CDH1: CADHERINA 1.

CDH9: CADHERINA 9.

CG: DINUCLEÓTIDO CITOSINA-GUANINA.

CCND1: CICLINA D1 ESPECÍFICA DE G1/S.

CDC42: HOMÓLOGO DE LA PROTEÍNA 42 DE CONTROL DE LA DIVISIÓN CELULAR.

CIP4: PROTEÍNA 4 QUE INTERACTÚA CON CDC42, PARTICIPA EN EL TRÁFICO DE CÉLULAS T DEPENDIENTE DE INTEGRINA.

CK5: CITOQUERATINA TIPO II.

C-MYC: HOMÓLOGO DEL ONCOGÉN VIRAL DE LA MIELOCITOMATOSIS AVIAR.

CREB: CAMP RESPONSE ELEMENT-BINDING, FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN.

COX2: INHIBIDOR DE CICLOOXIGENASA 2.

CTC: CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.

CXCL12: LIGANDO PARA EL RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G DEL RECEPTOR 4 DE QUIMIOCINAS CON MOTIVO CXC.

CXCR4: RECEPTOR DE SUPERFICIE ACOPLADO A PROTEÍNAS G DE SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANA.

DCTD: DESOXICITIDILATO DESAMINASA.

DDR1: DISCOIDINA DOMINIO RECEPTOR TIROSINA QUINASA 1.

DNMT: DNA METILTRANSFERASA.

E2F: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADO EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR.

EDTA: ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO.

EGFR: RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

EZH2: POTENCIADOR ZESTE 2 DE LA SUBUNIDAD 2 DEL COMPLEJO REPRESIVO DE CROMATINA 2.

EMT: TRANSICIÓN EPITELIAL A MESÉNQUIMA.

EPCAM: MOLÉCULA DE ADHESIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES.

ER: RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.

EREG: EPIRREGULINA, LIGANDO DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) Y EL RECEPTOR TIROSINA QUINASA 4 ERB-B2 ESTRUCTURALMENTE RELACIONADO (ERBB4).

ESR1: RECEPTOR DE ESTRÓGENO 1.

FAT4: CADHERINA ATÍPICA FAT 4.

FDXR: FERREDOXINA REDUCTASA.

FGF: FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS.

FGFR4: FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 4.

FOXA1: FACTOR NUCLEAR DE HEPATOCITOS 3-ALFA.

FOXM1: CAJA DE HORQUILLA 1, ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL IMPLICADO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

FUT5: FUCOSILTRANSFERASA 5, PARTICIPA EN EL PROCESO METABÓLICO DE LA CERAMIDA.

GALNT: POLIPÉPTIDO GALNT1 N-ACETILGALACTOSAMINILTRANSFERASA 1.

GATA3: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN A UNA SECUENCIA DE DNA EN CELULAS LUMINALES.

GLOBOCAN: OBSERVATORIO GLOBAL DEL CÁNCER.

GLT25D2: HIDROXILISINA GALACTOSILTRANSFERASA 2.

GO: ONTOLOGÍA GENÉTICA PARA ANOTACIÓN FUNCIONAL DE GENES.

GSTP1: GLUTATIÓN S-TRANSFERASA PI 1.

HBEGF: FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A EGF QUE SE UNE A HEPARINA.

HER2: RECEPTOR 2 DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO.

HGF: FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS.

HIF1A: SUBUNIDAD ALFA DEL FACTOR 1 INDUCIBLE POR HIPOXIA.

HIN-1: HIGH IN NORMAL 1 ACTÚA COMO SUPRESOR TUMORAL.

HS-578-T: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

IAP: INTEGRINA ASOCIADA A PROTEÍNA TAMBIÉN CONOCIDA COMO CD47.

IARC: AGENCIA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE CÁNCER.

ICAM1: MOLÉCULA DE ADHESIÓN ENDOTELIAL.

IGF1: FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA.

IL-6: INTERLEUCINA 6.

IL-8: INTERLEUCINA 8.

ISWI: PROTEÍNA REMODELADORA DE LA CROMATINA.

INEGI: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA.

INO80: COMPLEJO REMODELADOR DE LA CROMATINA DEPENDIENTE DE ATP.

JARID1B: ENZIMA MULTIDOMINIO QUE ES PARTE DE LA SUBFAMILIA KDM5.

JMJD2C: DEMETILASA DE HISTONAS QUE DESMETILA LA HISTONA 3 Y 2.

JMJD3: DEMETILASA DE HISTONA QUE REGULA LA TRIMETILACIÓN DE LA HISTONA H3.

KDM: DESMETILASA DE HISTONA EN RESIDUOS DE LISINA.

KDM5B: LISINA DESMETILASA 5B.

KEGG: ENCICLOPEDIA DE GENES Y GENOMAS DE KIOTO PARA LA ANOTACIÓN FUNCIONAL EN CONTEXTO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.

KI-67: PROTEÍNA DE LAS CÉLULAS CUYO NIVEL AUMENTA A MEDIDA QUE ESTAS SE PREPARAN PARA LA DIVISIÓN CELULAR.

KLF4: FACTOR 4 KRUPPEL-LIKE (KLF3) ES UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN.

KLK11: PEPTIDASA RELACIONADA CON LA CALICREÍNA 11.

KLK12: PEPTIDASA RELACIONADA CON LA CALICREÍNA 12.

KLK13: PEPTIDASA RELACIONADA CON LA CALICREÍNA 13.

L1CAM: MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR 1.

LIMK: PROTEÍNA PEQUEÑA DEL COMPLEJO DE DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA RICA EN PROLINA 4A

LINE: ELEMENTOS NUCLEARES INTERCALADOS LARGOS.

LSD1: HISTONA DESMETILASA.

LOX: LISIL OXIDASA.

MAP3KI: PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS.

MDA-MB-231: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

MDA-MB-436: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

MDM2 (MURINE DOBLE MINUTE 2): REGULADOR NEGATIVO DEL SUPRESOR TUMORAL P53.

MCF-7: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA LUMINAL.

MCF-12A: LÍNEA CELULAR DE CÉLULAS MAMARIAS NO TUMORAL.

MEC: MATRIZ EXTRACELULAR.

MET: TRANSICIÓN MESEQUIMAL A EPITELIAL.

MICRORNA: ARN PEQUEÑO DE ENTRE 19 A 25 NUCLEÓTIDOS.

MIR770: MICRORNA 770.

MLH1: HOMÓLOGO 1 DE MUTL, QUE FUNCIONA COMO GEN SUPRESOR DE TUMORES.

MMP-1: METALOPROTEASA 1.

MMP-8: METALOPROTEASA 8.

MMP-13: METALOPROTEASA 13.

NANOG: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN A HOMEBOX.

N-COR: CORREPRESOR 1 DE RECEPTOR NUCLEAR ES UN CORREGULADOR TRANSCRIPCIONAL.

NF-KB: FACTOR NUCLEAR POTENCIADOR DE LAS CADENAS LIGERAS KAPPA DE LAS CÉLULAS B ACTIVADAS.

NOTCH: PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA CON DOMINIOS EGF EXTRACELULAR REPETIDOS.

NURD/MI-2/CHD: COMPLEJO REMODELADOR DE LA CROMATINA DEPENDIENTE DE ATP CON ACTIVIDAD DE DESACETILASA DE HISTONAS.

NWASP: PROMUEVE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA.

P16: INHIBIDOR 2A DE QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA QUE FUNCIONA COMO SUPRESOR TUMORAL.

PCR: REACCIÓN EN CADENA POLIMERSA.

PDGF: FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS.

PGE2: PROSTAGLANDINA E2.

PI3K: FOSFATIDILINOSITL QUINASA 3.

PI3KCA: FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA ISOFORMA ALFA.

P53: PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES.

PR: RECEPTOR DE PROGESTERONA.

PRC-2: COMPLEJO REPRESIVO DE LA TRANSCRIPCIÓN: POLYCOMB2.

OCT4: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN A OCTÁMERO 4.

OPN: OSTEOPONTINA.

RHOA: MIEMBRO A DE LA FAMILIA HOMÓLOGA DE RAS, ES UNA PEQUEÑA PROTEÍNA GTPASA.

RAC: PROTEÍNA DE UNIÓN A GTP.

RARB: RECEPTOR DE ÁCIDO RETINOICO BETA.

RASS-F1: MIEMBRO DE FAMILIA DE DOMINIO DE ASOCIACIÓN RAS 1.

RECK1: PROTEÍNA RICA EN CISTEÍNA INDUCTORA DE REVERSIÓN CON MOTIVOS KAZAL.

ROCK: PROTEÍNA QUINASA ASOCIAD A RHO.

RPL34: PROTEÍNA RIBOSOMAL L34.

RPM: REVOLUCIONES POR MINUTO.

SAM: S-ADENOSIL-METIONINA.

SDAD1: PROTEÍNA SDA CON DOMINIO.

SAE1: SUBUNIDAD 1 DE LA ENZIMA ACTIVADORA SUMO1, SE UNE A UBA2.

SET8: HISTONA LISINA METILTRANSFERASA QUE MONOMETILA EL RESIDUO DE LISINA 20 DE LA HISTONA 4.

SET9: HISTONA METILTRANSFERASA QUE TRIMETILA ESPECÍFICAMENTE EL RESIDUO DE LISINA 20 DE LA HISTONA 4.

SFRP: PROTEÍNA QUE CONTIENE UN DOMINIO RICO EN CISTEÍNA HOMÓLOGO AL SUPUESTO SITIO DE UNIÓN A WNT DE LAS PROTEÍNAS FRIZZLED.

SINE: ELEMENTOS NUCLEARES CORTOS INTERCALADOS QUE FUNCIONAN COMO RETROTRANSPONES.

SK-BR-3: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HER2+.

SLUG: REPRESOR TRANSCRIPCIONAL 2 DE LA FAMILIA DEL SNAIL.

SMAD: PROTEÍNAS QUE FUNCIONAN A NIVEL CELULAR COMO SEGUNDO MENSAJERO.

SNAIL1: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE DEDOS DE ZINC QUE PERTENECE A UNA SUPERFAMILIA MÁS GRANDE CONOCIDA COMO SNAI.

SOX2: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CUYA FUNCIÓN ES ESENCIAL EN EL MANTENIMIENTO DE LA AUTO-RENOVACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS NO DIFERENCIADAS.

SPP1: FOSFOPROTEÍNA SECRETADA 1, ESTÁ IMPLICADA EN LA UNIÓN DE LOS

OSTEOCLASTOS A LA MATRIZ ÓSEA MINERALIZADA.

SRC: PROTEÍNA TIROSINA QUINASA.

STAT: FAMILIA DE PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE TRANSCRIPCIÓN.

SWI/SNF: ES UN COMPLEJO PROTEICO REMODELADOR DEL EMPAQUETAMIENTO DEL ADN EN LOS NUCLEOSOMAS.

TAM: MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR.

TBE: BUFFER TRIS-BORATO-EDTA.

TBC1D2B: MIEMBRO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CON DOMINIO TBC1 B2.

TCGA: ATLAS DEL GENOMA DEL CÁNCER.

TDG: TIMINA ADN GLICOSILASA.

TDSF: FACTORES SECRETADOS DERIVADOS DE TUMORES.

TET: DIEZ-ONCE TRASLOCASAS QUE CATALIZAN LA OXIDACIÓN SUCESIVA DE LA 5-METILCITOSINA.

TGFB: FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA.

TIMP3: INHIBIDOR DE METALOPROTEASAS 3.

TWIST: FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN BHLH.

USP44: PEPTIDASA ESPECIFICA DE UBIQUITINA 44, AYUDA A REGULAR EL PUNTO DE CONTROL DEL ENSAMBLAJE DEL HUSO AL PREVENIR EL INICIO TEMPRANO DE LA ANAFASE.

VCAM1: PROTEÍNA DE ADHESIÓN ENDOTELIAL.

VEGF: FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR.

WASP: PROTEÍNA DEL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.

WHSC1: PROTEÍNA WOLF HIRSCHHORN SYNDROME CANDIDATE 1 ES UNA HISTONA-METILTRANSFERASA.

WNT: SON UNA GRAN FAMILIA DE GLUCOPROTEÍNAS SEGREGADAS QUE DESEMPEÑAN FUNCIONES ESENCIALES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL Y EN EL MANTENIMIENTO TISULAR.

XBP1: PROTEÍNA DE UNIÓN A LA CAJA X 1, ES UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULA LOS GENES DEL MHC DE CLASE II AL UNIRSE A UN ELEMENTO PROMOTOR DENOMINADO CAJA X.

ZDHHC20-AS1: PALMITOILTRANSFERASA 20 DE TIPO DHHC CON DEDOS DE ZINC.

ZEB: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE DEDOS DE ZINC.

ZR-75-1: LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA.

Resumen

A nivel mundial el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre la población femenina; en México desde el 2006 es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. La constante acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células influyen en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y estos cambios varían según el subtipo molecular y los métodos de cultivo. De manera general, el cultivo en monocapas (2D) es el más utilizado para el estudio de la biología del cáncer, sin embargo, presenta ciertas limitaciones para recrear fielmente el microambiente y los procesos moleculares de los tumores *in vivo*, por lo anterior, se ha propuesto el uso de métodos de cultivo 3D organotípicos que permitan optimizar las condiciones de cultivo para recrear características biológicas y moleculares tales como: interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, heterogeneidad celular, cinética de crecimiento diferencial, desarrollo de diferentes gradientes en el microambiente, de manera, que, las células reciban estímulos del ambiente local resultando en un cambio en la actividad de vías de señalización, expresión génica y alteración del patrón epigenético que incluye la metilación del ADN. La metilación del ADN es una modificación epigenética que se ve ampliamente influenciada por el microambiente tumoral y frecuentemente esta alterada en cáncer.

En este estudio, analizamos el impacto del cultivo en 3D de células de cáncer de mama (Hs578T, BT-474 y SK-BR-3) sobre el perfil de metilación global del ADN usando microarreglos de metilación, además, se hizo uso de un modelo *in vivo* de xenotransplantes de células de cáncer de mama que nos permitió evaluar los fenotipos descritos en la literatura y la capacidad invasiva y metastásica de las líneas celulares de estudio que corresponden a diferentes subtipos moleculares, para clasificarlas según su agresividad y distinguir su capacidad invasiva y metastásica *in vivo*. Los resultados obtenidos nos permitieron identificar los genes metilados diferencialmente a nivel promotor entre nuestras líneas celulares, para poder agruparlos en genes compartidos y exclusivos de cada línea celular de estudio, con lo anterior se asoció una firma genética a invasión y metástasis para las tres líneas celulares de estudio, además, se sugirió un gen como blanco potencial para la terapia epigenética contra el cáncer de mama por sus características moleculares e interacciones potenciales con otras proteínas.

Abstract

Breast cancer is the most frequent neoplasia among the female population in the world; in Mexico since 2006, it is the leading cause of cancer death in women. The constant accumulation of genetic and epigenetic alterations in cells influence the development and progression of breast cancer and these changes vary according to the molecular subtype and culture methods. In general, monolayer culture (2D) is the most widely used for the study of cancer biology, however, it presents certain limitations to faithfully recreate the microenvironment and molecular processes of tumors in vivo, therefore, it is has proposed the use of 3D organotypic culture methods that allow optimizing culture conditions to recreate biological and molecular characteristics such as: cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, cell heterogeneity, differential growth kinetics, development of different gradients in the microenvironment, so that cells receive stimuli from the local environment resulting in a change in the activity of signaling pathways, gene expression and alteration of the epigenetic pattern that includes DNA methylation. DNA methylation is an epigenetic modification that is widely influenced by the tumor microenvironment and is frequently altered in cancer.

In this study, we analyzed the impact of 3D culture of breast cancer cells (Hs578T, BT-474 and SK-BR-3) on the global DNA methylation profile using methylation microarrays, in addition, using a in vivo model of Xenotransplants of breast cancer cells that allowed us to evaluate the phenotypes described in the literature and the invasive and metastatic capacity of the study cell lines that correspond to different molecular subtypes, to classify them according to their aggressiveness and distinguish their invasive capacity and metastatic in vivo. The results obtained allowed us to identify the differentially methylated genes at the promoter level between our cell lines, to group them into shared and exclusive genes of each study cell line, with the above a genetic signature was associated with invasion and metastasis for the three cell lines. study, in addition, a gene was suggested as a potential target for epigenetic therapy against breast cancer due to its molecular characteristics and potential interactions with other proteins.

1 Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer puede definirse como un conjunto de enfermedades provocadas por alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden afectar diferentes partes del organismo. Dichas enfermedades se caracterizan por el desarrollo de células anormales que adquieren ciertas capacidades que les confieren alta capacidad invasiva y proliferativa de manera autónoma para formar masas llamadas tumores (Bertram, 2000).

La transformación de una célula normal en tumoral conlleva una pérdida de su capacidad para responder a señales de crecimiento y se genera como consecuencia la progresiva acumulación de defectos en el genoma, que, en conjunto contribuyen al desarrollo y progresión de un cáncer clínicamente manifiesto. La clasificación de estas enfermedades es en función del tejido en donde se desarrolla (carcinomas, sarcomas, hematopoyéticos, melanomas, tumores del tejido nervioso y órganos reproductivos, entre otros), el órgano que les da origen: primarios o secundarios (metastásicos), las características clínicas e histopatológicas, el estadio o extensión del tumor y el perfil inmunológico y molecular (Acuña *et al.*, 2014).

Esta enfermedad es multifactorial, por lo que el riesgo de su desarrollo se atribuye a distintos agentes cancerígenos entre los que podemos mencionar: la radiación (ionizante, ultravioleta), la exposición prolongada a ciertos productos químicos (procedentes de humo de tabaco, de la industria, contaminación general, etc), agentes infecciosos como virus, parásitos o bacterias, estilo de vida que incluye hábitos alimenticios y factores hereditarios (Acuña *et al.*, 2014).

Debido al incremento de casos y defunciones, costos de atención médica y a los efectos perjudiciales que tiene sobre la vida de cada una de las personas que lo padecen, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública. La detección de este en una fase avanzada, la falta de diagnóstico oportuno y tratamiento son problemas frecuentes que aumentan el número de fallecimientos. En este sentido, más del 90% de los países con altos ingresos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que entre los países con bajos ingresos este porcentaje es

inferior. A nivel mundial es la primera causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo y estas cifras van en aumento según datos reportados en el GLOBOCAN (Wild *et al.*, 2020).

Los cinco tipos de cáncer que causan mayor número de fallecimientos al año según la Organización Mundial para la salud son:

- Pulmonar: 1,7 millones de defunciones
- Mamario: 1,1 millones de defunciones
- Hepático 787 200 defunciones
- Próstata: 681600 defunciones
- Colorrectal: 585 600 defunciones

En México cada año son reportados 120,000 casos de cáncer de los cuales 75,000 fallecen debido a detecciones tardías, convirtiendo a este padecimiento en una de las principales causas de muerte en la población mexicana. En mujeres la incidencia es de un 55% mientras que para los hombres es de un 45% (Bray *et al.*, 2018).

1.2 Cáncer de mama

La mama es un órgano de secreción externa que consta de una porción glandular rodeada por estroma, tejido conectivo, vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas (Harbeck *et al.*, 2019).

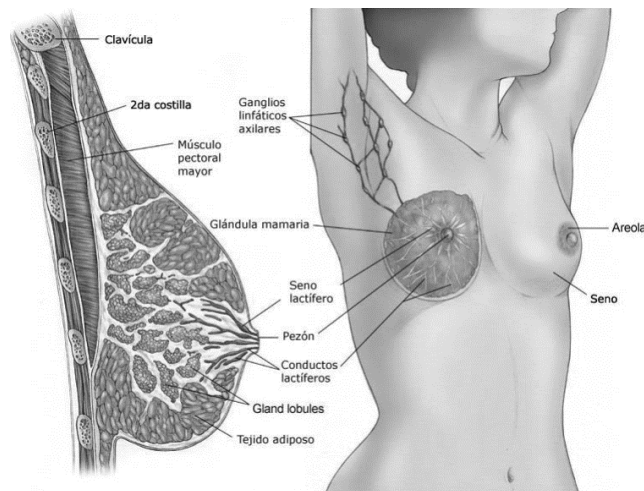


Figura 1. Anatomía de la mama femenina: imagen tomada de Publicación de la Sociedad Americana Contra el Cáncer (American Cancer Society, ACS) 2019.

La porción glandular está compuesta por los lóbulos que están constituidos por unidades acinares llamadas lobulillos y es donde se sintetiza y produce la leche y el otro componente de la glándula son los ductos transportadores que se conecta directamente al pezón a través de los lóbulos y es por donde se transporta la leche (Harbeck *et al.*, 2019).

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por la presencia de elementos genéticos y epigenéticos que en conjunto conllevan a que las células del seno crezcan de forma descontrolada formando tumores que pueden diseminarse hacia otras partes del cuerpo. Se estima que el 85% de todos los cánceres de mama tienen su origen en las células que recubren los ductos por donde se transportan la leche (carcinomas ductales) y en las células productoras de leche (carcinomas lobulillares), mientras que el 15% restante son casos de cáncer de mama asociados a factores hereditarios (Harbeck *et al.*, 2019).

Esta enfermedad representa un grave problema de salud pública a nivel mundial que amenaza a las mujeres de todos los niveles socioeconómicos y en su minoría a hombres.

1.2.1 Epidemiología

A nivel mundial el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre la población femenina según las estadísticas de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) reportadas en la base de datos GLOBOCAN; tan solo en el 2020 el cáncer de mama representó el 24.5% de todas las neoplasias reportadas, registrando una tasa ajustada por edad ASR (por las siglas de Age Standardized Ratio) de 47.8 nuevos casos por cada 100, 000 mujeres (Figura 1). Las tasas de supervivencia varían mucho en todo el mundo, registrando desde un 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando a un 60% en países de ingresos medios, hasta 40% en países de bajos ingresos (GLOBOCAN 2020). Para los países con bajos ingresos, las tasas bajas de supervivencia pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, falta de servicios adecuados para el diagnóstico y tratamiento oportuno.

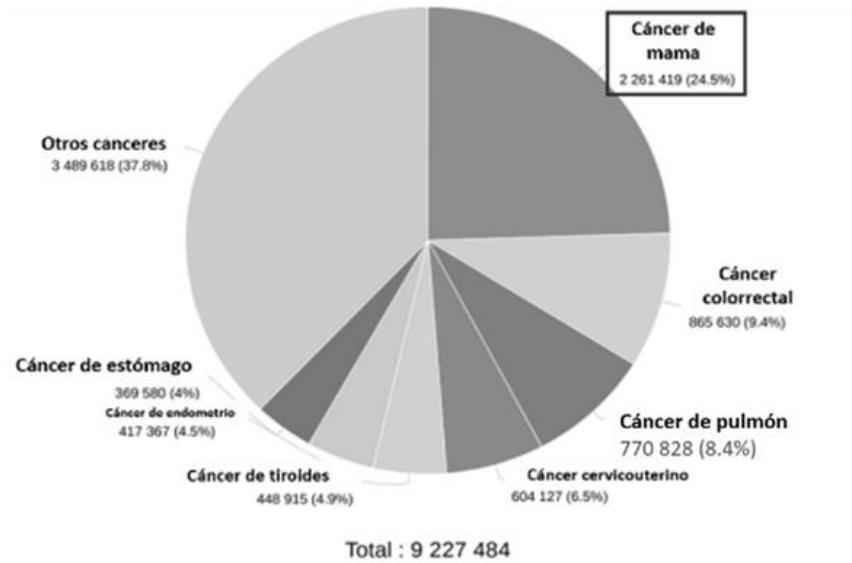


Figura 2. Nuevos casos de cáncer en la mujer a nivel mundial: GLOBOCAN 2020.

En la Figura 2, se observa que el cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia con un porcentaje del 24.5% de un total de 9, 227, 484 nuevos casos hasta el año 2020 (GLOBOCAN 2020).

Desde el 2006 el cáncer de mama se convirtió en la principal causa de mortalidad (atribuido a recurrencia y metástasis) por cáncer en la población femenina de México. Anualmente según datos del INEGI, el cáncer de mama presenta una incidencia de 20,444 casos nuevos y tan solo en el 2020 se registró la tasa de incidencia más alta; 35.24 casos por cada 100 000 mujeres de 20 años o más, pero esto varía según la entidad federativa, se ha establecido que el mayor número de muertes por cáncer de mama se encuentran en el norte del país con un 31% del total, seguidos por los estados del centro con un 21% y del sur con un 14% (INEGI 2020).

Algunas razones del aumento de casos por cáncer de mama son: aumento de la población de mujeres de 35 a 54 años, un mayor número de tamizajes (estudios de detección), factores de riesgo asociados a cambios socioculturales y ambientales y la predisposición genética a mutaciones en genes BRCA1 y BRCA2 ligados a esta enfermedad. Sin embargo, la incidencia podría reducirse en los próximos años ya que se calcula que entre el 40 a 50% de los cánceres pueden prevenirse si se adoptan mejores hábitos en el estilo de vida, la vacunación, mejoras en el tratamiento y

diagnósticos oportunos (INEGI 2020).

1.2.2 Factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la que se pueden distinguir un número significativo de factores de riesgo que permiten identificar a mujeres con mayor predisposición a desarrollar esta enfermedad, dichos factores se pueden dividir en dos grupos: modificables y no modificables (Lukasiewicz *et al.*,2021).

Los factores de riesgo modificables están asociados al estilo de vida e incluyen la baja actividad física, el consumo de alcohol y tabaco, la alimentación relacionada a la falta de suplementación vitamínica suficiente, obesidad y exposición prolongada a tratamientos hormonales, antidepresivos o antibióticos. Por otra parte, se tienen a los factores no modificables que engloban antecedentes familiares, antecedentes de enfermedades ginecológicas, mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *P53*, la edad de entre 45-50 años existe mayor riesgo, la densidad mamaria, la nuliparidad, la menstruación temprana y el término de ésta después de los 55 años. Es importante recalcar que solo del 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios y el 90-95% restante son esporádicos (Lukasiewicz *et al.*,2021).

1.2.3 Clasificación histológica

La mayoría de los cánceres de seno son de origen epitelial y reciben el nombre de carcinomas en caso de ser tumores malignos, mientras que aquellos cánceres que se originan a partir del epitelio glandular reciben el nombre de adenocarcinomas (Veronesi *et al.*, 2017, Lukasiewicz *et al.*,2021). Según las lesiones, el comportamiento, aspecto y expansión de los tumores, histológicamente estos se pueden agrupar en dos tipos, in situ e invasivos:

- In situ: es el tipo de cáncer de mama más común, las células de los lóbulos y conductos se mantienen sin daño por lo tanto sin invasión del estroma. Este tipo de tumores son potencialmente curables.
- Invasivos: este tipo de cáncer es aquel que atraviesa la pared del conducto lácteo e invade los tejidos de la mama, con el paso del tiempo puede propagarse a los ganglios linfáticos y otras áreas del cuerpo (metástasis).

1.2.4 Clasificación molecular

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con un espectro muy amplio de factores clínicos, pronósticos, patológicos y características moleculares, por lo cual se pueden distinguir distintos subtipos en esta enfermedad. El desarrollo de distintos métodos de análisis molecular (como microarreglos de ADN o secuenciación) ha permitido establecer las diferencias entre cada subtipo conocido. De manera muy clásica y según los perfiles de expresión genómica, el cáncer de mama se clasifica por el estado de expresión (positivo o negativo) de los receptores hormonales para progesterona (PR+), estrógeno (ER) y por la sobreexpresión/amplificación del receptor epitelial humano 2 (HER2) en 5 grupos: luminal A, luminal B, normal-like, HER2/neu+ y basal-like (Harbeck *et al.*, 2019, Lukasiewicz *et al.*,2021).

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Clasificación	Expresión de receptores	Características moleculares
Luminal A	ER+,PR+/-, HER2-	Bajo Ki-67, respuesta a la terapia endocrina
Luminal B	ER+,PR+/-, HER2+	Bajo Ki-67, resistencia a la quimioterapia
HER2+	ER+,PR-, HER2+	Alto Ki-67, respuesta a la quimioterapia
Basal-like	ER-,PR-,HER2-	Alto Ki-67, expresión de EGFR y citoqueratinas 5 y 6
Normal-like	ER+, PR+, HER2+	Bajo Ki-67, genes expresados por tejido adiposo y otros tipos celulares no epiteliales

Los tumores de tipo luminal A se caracterizan por la expresión de ER y PR, son de bajo grado histológico, lo que indica que son de lento crecimiento y diseminación. Este tipo de tumores no presenta expresión de receptores para HER2, poseen baja expresión de Ki-67 (marcador de proliferación celular) en un rango del 20 a 14%, mutaciones en *PIK3CA*, *MAP3KI*, *GATA3*, *FOXA1* y sobreexpresión de las proteínas *ER* y *XBP1*. Los tumores luminales tipo B son de alto grado histológico, ER positivos, PR positivos o negativos y HER2 positivos o negativos. Presentan altos niveles de

expresión de Ki-67 y mutaciones en *PIK3CA*, sobreexpresión de *CCND1*, *MDM2* y pérdida de la proteína *ATM* relacionada a reparación celular (Lukasiewicz *et al.*,2021). Los tumores positivos para HER2+ presentan sobreexpresión de *CCND1*, de las proteínas *FGFR4*, *Ki-67* y *HER2*, *EGFR*, *GATA3*, *BCL-2*, *ER* y mutaciones en *P53*, *PIK3CA* y *APOBEC*, estos tumores responden bien a la quimioterapia. El subtipo de cáncer normal-like se caracteriza por la expresión de genes asociados al tejido adiposo o células del estroma, estos tumores son de bajo grado, positivos para ER, PR y HER2+ y presentan baja expresión de Ki-67 con bajos niveles proliferativos (Lukasiewicz *et al.*,2021).

El subtipo basal-like o triple negativo está enriquecido en tumores que tienen un comportamiento más agresivo, un patrón metastásico heterogéneo, mal pronóstico a pesar de responder inicialmente a la quimioterapia y se caracterizan por la falta de expresión de ER, PR y HER2+. La biología de este subtipo incluye una alta actividad proliferativa, aumento del infiltrado inmunológico (macrófagos y fibroblastos asociados a tumor), mutaciones en las proteínas *BRCA 1* o *BRCA 2*, *P53*, *PIK3CA*, *NOTCH* y la activación de proteínas como: *FOXM1*, *MYC* y *EGFR*, alto grado de expresión de proteínas reparadoras del ADN, amplificaciones locales y gran inestabilidad genómica. Además, dado su gran heterogeneidad, dentro de este tipo de tumor se puede hacer una subtipificación en otros seis subtipos que incluyen: basal-like 1 y 2, mesenquimatoso, mesenquimatoso similar a células madre, inmunomodulador y positivos a receptores de andrógenos (Lukasiewicz *et al.*,2021, Derakhshan *et al.*, 2022).

1.3 Hallmarks del cáncer

La carcinogénesis es un proceso en que una célula evade los mecanismos normales de control de crecimiento y se divide de forma descontrolada; es resultado de alteraciones químicas o biológicas en un proceso que involucra cambios a nivel genético y epigenético que se acumulan progresivamente en el genoma y contribuyen al inicio y progresión tumoral. De esta manera, se han definido las características biológicas adquiridas por las células normales hacia su transformación a la malignidad, en donde las células sostienen la emisión de señales de proliferación, evaden los

supresores de crecimiento, desarrollan resistencia a la muerte celular y presentan replicación ilimitada a consecuencia de la inducción de inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones genéticas y reprogramación de epigenética que pueden generar angiogénesis sostenida, activar la invasión y metástasis, además conducen a reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune. Así pues, se induce plasticidad fenotípica y se ha reconocido la influencia microbiomas en la carcinogénesis (Hanahan 2022).



Figura 3. Características distintivas del cáncer (Hanahan 2022).

1.3.1 Invasión y metástasis en cáncer de mama

La metástasis se define como la diseminación de células tumorales del sitio primario de origen a sitios distantes para formar tumores secundarios. Este mecanismo es de gran importancia en la investigación del cáncer debido a que se le atribuyen el 90% de todas las muertes por esta enfermedad, induce patrones de resistencia a la terapia y altas tasas de recurrencia por lo anterior, es necesario elucidar los mecanismos moleculares que subyacen su origen para de esta forma generar métodos diagnósticos más oportunos y tratamientos eficaces (McSherry *et al.*, 2007, Neophytou *et al.*, 2017).

La migración e invasión son procesos complejos que comprenden varias etapas: la activación de la transición epitelio/mesénquima (EMT por sus siglas en inglés), la

invasión local, la intravasación, la capacidad de sobrevivir en el torrente circulatorio, la extravasación, y el establecimiento de células tumorales en tejidos del órgano objetivo de la metástasis (Neophytou *et al.*, 2017).

La metástasis se acompaña de una acumulación de cambios genéticos, epigenéticos y señales que surgen del microambiente tumoral que en conjunto aumentan la plasticidad morfológica e integridad celular y promueven un fenotipo celular más agresivo y la movilidad de células tumorales. Esta condición, es iniciada por una subpoblación de células genéticamente inestables dentro de la masa tumoral primaria que se ven impulsadas a colonizar el cuerpo a través de su disociación del tumor seguido de la invasión a tejidos circundantes y la transición a través del sistema linfático y circulatorio escapando de las señales de muerte y vigilancia inmunológica soportando cambios bioquímicos dinámicos para finalmente colonizar órganos distantes mediante la modulación e interacción con el microambiente local (Saha *et al.*, 2021).

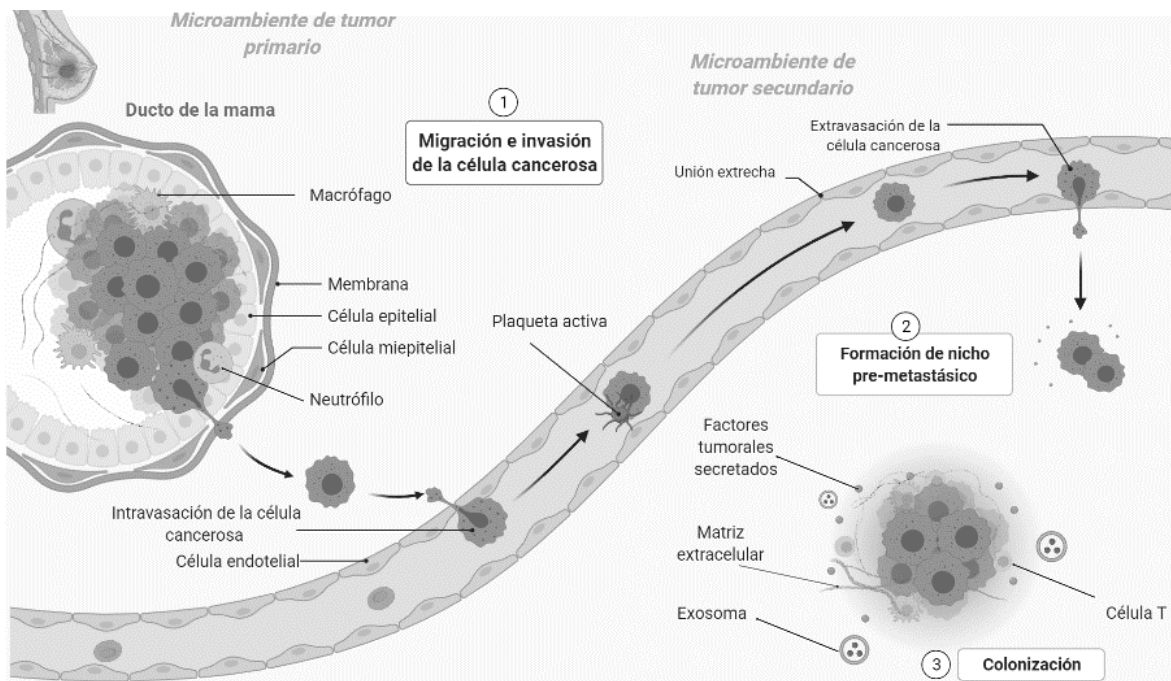


Figura 4. Representación de la cascada metastásica en cáncer de mama. Figura realizada en Biorender.

El proceso metastásico implica una serie de pasos (que se conoce como cascada

metastásica) que ocurren en paralelo y que son consecuencia de la constante acumulación de cambios tanto genéticos como epigenéticos en la célula. El tumor primario asociado con su microambiente abarca: células T, fibroblastos asociados a tumor (CAFs), células madre mesenquimales, adipocitos, macrófagos asociados a tumor (TAMs), la matriz extracelular (MEC), los gradientes de concentración de nutrientes, oxígeno, pH, cinética de crecimiento (Meirson *et al.*, 2020; Saha *et al.*, 2021).

1.3.1.1 Invasión local y modificación del citoesqueleto

El citoesqueleto se compone de microtúbulos y filamentos intermedios de actina que están asociados para mantener la forma e integridad celular, en la metástasis se experimenta remodelación del citoesqueleto para facilitar la invasión y motilidad, este proceso se inicia con la formación de protrusiones pequeñas por la polimerización de filamentos de actina que son proyectadas hacia el exterior de las células llamadas filopodia, lamelipodia, invadopodia o podosomas. Los reguladores moleculares de la remodelación de actina y la migración celular son *Rho GTPasas*, *RAC*, *CDC42*, y la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) que son activados por factores de crecimiento, receptores de citocinas, cadherinas e integrinas. *RhoA* recluta *ROCK* que fosforila la quinasa LIM, la cadena ligera de miosina (MLC) y la fosfatasa MLC, generando así fibras de estrés de actina y fuerza contráctil (Fares *et al.*, 2022). *CDC42* y la proteína que interactúa con *CDC42* (*CIP4*) conducen a la activación de la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (*WASP*), *N-WASP* y el complejo Arp2/3 para formar filopodios e invadopodios. *RAC1* induce una cascada que controla la formación de lamelipodia y estructuras ramificadas de actina. Hay otra clase de proteínas llamadas *WAVE1* y *WAVE2* que median una vía río abajo de las GTPasas y conducen a la formación de lamelipodia por asociación con el complejo Arp2/3 de la misma manera que *WASP* y este último puede mediar el movimiento celular por esta vía (Meirson *et al.*, 2020; Fares *et al.*, 2022). La regulación de la cofilina a través de *LIMK* y la fosfolipasa C es importante para iniciar la despolimerización de filamentos de actina durante la formación de protrusiones celulares en respuesta a la quimiotaxis. De esta forma las adhesiones focales entre las células y células-matriz extracelular (MEC) van perdiendo fuerza para comenzar con la transformación de la matriz extracelular (Meirson *et al.*,

2020; Fares *et al.*, 2022).

1.3.1.2 Transformación de la MEC

Las células tumorales están incrustadas en una densa red de MEC formada por colágeno, laminina, fibronectina, elastina y glicoproteínas, hialuronano y proteoglicanos (Fares *et al.*, 2022). Estas moléculas son degradadas proteolíticamente y remodeladas durante la metástasis por enzimas como hepsina, catepsina, heparanasa y metaloproteinasas de matriz (MMP). El colágeno que da soporte tisular y la estabilidad estructural es degradado por la *MMP-1*, *MMP-8* y *MMP-13*, las que también degradan lamininas, induciendo remodelación de la MEC durante la inducción de la cascada metastásica. Otra enzima llamada lisil oxidasa (LOX) media el entrecruzamiento de colágeno fibrilar con fibronectina y elastina e induce el endurecimiento del estroma tumoral a través de proteínas proteolíticas creando, una especie de vía para la regulación del movimiento celular a través del estroma tumoral para permitir la extravasación a la vasculatura más cercana (Fares *et al.*, 2022).

El receptor de dominio de discoidina 1 (DDR1), asociado con la comunicación con el estroma, está muy involucrado en la remodelación de la MEC, pues cuando los colágenos, activan a la cinasa *PI3K*, *NOTCH* y *STAT3*, promoviendo la reactivación de células cancerosas latentes en sitios metastásicos y después la inducción de la división celular y migración. *DDR1* es un factor esencial que contribuye a la metástasis del cáncer de mama. La interacción entre las células tumorales y su nuevo medio ambiente es un factor crítico que determina el destino metastásico. La molécula de adhesión vascular 1 (VCAM1) en cáncer de mama interactúa con las integrinas ($\alpha4\beta1$) y TAMs para activar la vía *PI3K*, lo que promueve la supervivencia y el crecimiento y angiogénesis (Suresh *et al.*, 2023).

Los TAMs, FACs y las células inmunes también son cruciales en el remodelado de la MEC, por ejemplo, los TAMs se han asociado a la señalización de TGF- β que es un regulador maestro de la EMT y también confieren resistencia inmune (Suresh *et al.*, 2023).

1.3.1.3 La transición epitelial a mesenquimal

La disociación desde una masa celular agrupada en un microambiente que consta de una red rica en MEC y densa es el siguiente paso que deben superar las células que van a migrar. Una forma en que una célula tumoral logra esto es atravesando un cambio fenotípico impulsado bioquímicamente llamado transición epitelio-mesenquimal (EMT). Las células van perdiendo el contacto que existe entre ellas (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap) debido a la pérdida de cadherina, lo que provoca una disminución de los contactos, asociaciones sueltas y el logro de propiedades migratorias dando como resultado una supervivencia independiente del anclaje. La E-cadherina se une a beta-catenina, alfa-catenina y p120-catenina en estas uniones y media la señalización intracelular estableciendo una estrecha integración de uniones intercelulares, así como un vínculo firme con la MEC. Sin embargo, con la activación de la EMT, la expresión de E-cadherina se pierde y marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina se expresan (Suresh *et al.*, 2023).

Se ha observado que la vía de señalización de TGF- β es esencial para la activación de la EMT en la metástasis: se inicia con la unión de TGF- β al receptor de TGF- β tipo II, lo que conduce a la fosforilación del receptor tipo I TGF- β que fosforila el C-terminal de un complejo proteico río abajo: SMAD2/3. El receptor activa SMAD2, después de lo cual SMAD3 recluta a SMAD4, este complejo SMAD se transloca al núcleo donde junto con otros factores de transcripción como TWIST, SNAIL 1/2 (conocido como SLUG) y ZEB, regula la EMT (Hao *et al.*, 2019). Esta vía reprime la expresión del gen que codifica a E-cadherina por mecanismos epigenético de la siguiente manera, SNAIL 1 se une a la caja E de la E-cadherina a través de un dominio de dedo ZINC en su secuencia promotora y recluta el complejo represivo Polycomb2 (PRC-2) que media modificaciones de las histonas principalmente la metilación y la acetilación, silenciando así el gen CDH1. Así entonces, mientras SNAIL regula a la baja genes epiteliales, por otro lado, regula a la alza genes mesenquimales como los que codifican fibronectina. TWIST, es un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico que también participa en la regulación a la baja de la expresión de E-cadherina. HIF1 α , bajo condiciones hipóxicas, induce la expresión de TWIST y por lo tanto EMT.

Otra clase de factores de transcripción que intervienen en la EMT es *ZEB* que a menudo se activa a través de *SNAIL*. *TWIST* interactúa con *SNAIL*, lo que conduce a la expresión de *ZEB* y este factor se ha reportado como sobreexpresado en cáncer de mama en donde reprime E-cadherina. Adicionalmente la EMT puede ser inducida por otras moléculas de señalización como *PI3K*, *PDGF*, *FGF* y *HGF* (Fares *et al.*, 2022). La EMT es un proceso reversible, cuando una célula tumoral se somete a EMT y se desprende desde un tumor primario para viajar a través del cuerpo a otros órganos y establecer un tumor secundario se somete a una reversión desde un fenotipo a mesenquimatoso a epitelial (*MET* por sus siglas en inglés) para poder empezar la colonización secundaria (Meirson *et al.*, 2020).

1.3.1.4 Intravasación

Cuando las células alcanzan un fenotipo mesenquimal, logran modificar las barreras de la MEC y la membrana basal para poder extravasarse y entrar en el sistema linfático o los vasos sanguíneos y comienzan a viajar a lo largo del cuerpo se denominan células tumorales circulantes (CTC). Se ha demostrado que los CTC expresan EPCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) que es un biomarcador de metástasis a distancia y recurrencia tumoral (Fares *et al.*, 2022).

En el torrente sanguíneo, las células cancerosas están expuestas a condiciones adversas como estrés oxidativo, ataque inmunológico, fuerzas presión mecánica, anoikis, y falta de factores de crecimiento y citocinas. Por lo tanto, muchas CTC mueren. Sin embargo, la creciente evidencia sugiere que las células tumorales se asocian con las plaquetas activas para soportar diversos grados de estrés oxidativo y sufren modificaciones bioquímicas reversibles para resistir las condiciones adversas y protegerse de las fuerzas mecánicas. La asociación entre CTC y plaquetas permite la secreción de gránulos de plaquetas que proporcionan resistencia a la apoptosis, las plaquetas inducen la vía *TGF- β* , por liberación de este y de esta manera las CTC mantienen características mesenquimales (Fares *et al.*, 2022).

HER2/EGFR/HPSE/NOTCH representan firmas genéticas identificadas en CTC de pacientes con cáncer de mama que potencialmente metastatizan al cerebro. Las CTC

que expresan *CD44* y *CD47* en los pacientes con cáncer de mama sirven como marcadores de la población de CTC iniciadoras de metástasis. Los CTC también pueden resistir señales de muerte produciendo varios factores antiapoptóticos como *BCL-2* y también pueden escapar del sistema inmune mediante la secreción de quimiocinas como *IL-6* y *8* (Fares *et al.*, 2022).

1.3.1.5 Extravasación y colonización

Las CTC asociadas con las plaquetas facilitan la extravasación al permitir que las células se detengan en un lecho capilar y puedan las células tumorales empezar a desplegar una serie de moléculas que les permitan permeabilizar la membrana de los tejidos blanco y así poder extravasarse para empezar la última fase de la metástasis que es la formación de un nicho premetastásico y la colonización. Cuando las células se extravasan, se dice que están en un estado de dormancia, el que hace referencia a que primero se despliegan una serie de factores de crecimiento, exosomas, se empiezan a crear interacciones con la MEC de huésped, con las células que ahí existen, con la finalidad de poder modificar el microambiente del huésped y adaptarse para colonizar (Fares *et al.*, 2022).

1.3.2 Organotropismo metastásico

La metástasis, es un proceso no aleatorio conocido como "organotropismo metastásico", este involucra al nicho premetastásico y hace referencia al cómo es que diferentes tipos de cáncer predisponen la metástasis a órganos específicos debido a la liberación de factores secretados derivados de tumores (TDSF por sus siglas en inglés) que modifican a moléculas de adhesión, componentes de la matriz extracelular, vías de señalización y se encargan de crear interacciones con el microambiente del huésped con la finalidad de crear un entorno de apoyo para el crecimiento tumoral en un tejido distante antes de que las células tumorales se propaguen (Chen *et al.*, 2018). Este proceso organotrópico está regulado por múltiples factores en cáncer de mama como; el subtipo, las características moleculares de las células cancerosas (firmas de genes), el microambiente inmunológico del huésped, la diafonía e interacciones con células locales y las vías de señalización de células tumorales metastásicas, lo anterior

se resume en la figura, donde se observa por subtipo molecular la serie de firmas genéticas asociadas a metástasis a diferentes órganos en cáncer de mama (Chen *et al.*, 2018).






Hueso	Hígado	Cerebro	Pulmones	Nódulos linfáticos distantes
				
Luminal-HER2	HER2-enriquecido ER+, Luminal B, Luminal-HER2	HER-2 enriquecido Luminal-HER2 Triple negativo Basal-like	Triple negativo Basal-like Luminal B HER2+, p53-, receptores hormonales -	Tipo luminal HER2-enriquecido
Factores de crecimiento: IGF1, PGE2, TGFβ, PDGF y FGF2 Interleucinas: IL-11, IL-1, IL-6 PTHrP OPN Heparanasa Ruta RANKL-RANK Ruta dependiente de Src	Quimiocinas y receptores: CXCR4/cxcl12 Interleucinas: IL-6 Complejos de integrinas: α2β1, α5β1 N-Cadherina Genes regulados por HIF: LOX, OPN, VEGF, TWIST B-Catenina Señalización independiente de WNT Regulación negativa de genes ECM (Estromal)	ST6GALNAC5 Marcadores CSC: Nestina, CD133 y CD44 Factores de crecimiento: VEGF y HBEGF Quimiocinas y receptores: CXCR4 Citocinas: CK5 Metaloproteinasas: MMP-1 y MMP-9 Interleucinas: IL-8 Ang-2 COX2 L1CAM	Factores de crecimiento y sus receptores: TGFβ, EGFR, EREG, VEGF Metaloproteinasas de matriz: MMP-1 y MMP-2 COX2 LOX Inhibidores de BMP: GALNTs y Coco	Serin proteasas: calicreinas KLK10, KLK11, KLK12 y KLK13 Regulación negativa de la ruta de señalización BCR

Figura 5. Resumen de las metástasis organotrópicas del cáncer de mama. Imagen extraída y modificada de Neophytou *et al.*, 2018 y Chen *et al.*, 2020.

El cáncer de mama tiende a hacer metástasis comúnmente a los huesos (70% de los casos), cerebro (10-30% de los casos), hígado (30% de los casos) y pulmones (21-32% de los casos) en donde se pueden observar perfiles de expresión génica distinta.

De manera general, todos los subtipos de cáncer de mama son propensos a metástasis óseas, especialmente los subtipos ER/PR+/HER2+ (luminal-HER2). El subtipo ER/PR-/HER2+ (enriquecido con HER2) tiene una mayor probabilidad de metástasis cerebrales en comparación con el subtipo ER/PR+/HER2- (luminal A y luminal B). El subtipo enriquecido con HER2 también tiene más metástasis hepáticas en comparación con los subtipos HER2 (Chen *et al.*, 2018). Las pacientes con cáncer

de mama triple negativo o basal presentan principalmente metástasis pulmonares. En un análisis multivariable que compara diferentes subtipos, los subtipos luminal-HER2 y HER2 enriquecido muestran una tasa significativamente mayor de metástasis en el cerebro, el hígado y los pulmones que el subtipo luminal A HER2 negativo (Chen *et al.*, 2018). Tanto los subtipos de triple negativo de tipo basal como otros tienen una alta tasa de metástasis en el cerebro, los pulmones y los ganglios linfáticos distantes. Sin embargo, el subtipo de tipo basal se asocia específicamente con una baja tasa de metástasis en el hígado y los huesos. Si bien los cánceres metastásicos comparten mutaciones clave con los tumores primarios de los que proceden, a menudo desarrollan nuevas mutaciones a medida que evolucionan durante la metástasis y el tratamiento sin embargo el 84 % de los cánceres de mama contienen al menos una alteración genómica, que puede considerarse como objetivo del tratamiento por lo que, la combinación del valor predictivo de las alteraciones genómicas con la relevancia clínica podría ser de gran utilidad para la propuesta y el diagnóstico más eficaz de la metástasis (Chen *et al.*, 2018).

2. Antecedentes particulares

2.1 El epigenoma

La epigenética estudia los cambios heredables en la expresión génica que no modifican la secuencia primaria del ADN. Las modificaciones epigenéticas son reversibles y la mayoría de los cambios heredables se mantienen estables durante la replicación en los ciclos de división celular, sin embargo, estas modificaciones pueden alterarse en respuesta a estímulos intrínsecos, extrínsecos y ambientales, permitiendo de esta manera que las células tengan diferentes identidades mientras que mantienen la misma información genética (Zhou *et al.*, 2021).

El término epigenoma engloba al conjunto de mecanismos epigenéticos fisiológicos que pueden modificar la estructura de la cromatina y comprenden las modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas (acetilaciones, metilaciones, entre otras), modificaciones de por RNAs no codificantes (como RNAs largos y microRNAs) y la metilación del ADN en dinucleótidos CpG (Zhou *et al.*, 2021).

Las interacciones entre estas modificaciones regulan la manera en que se expresa el genoma en los distintos estadios del desarrollo, tipos celulares, procesos biológicos y enfermedades, así entonces, mientras que el código genético proporciona toda la información de un gen e indica cómo producir proteínas específicas, el epigenoma controla la expresión de dicha información (Zhou *et al.*, 2021).

Se ha reportado que los procesos epigenéticos pueden contribuir al inicio y progresión del cáncer alterando procesos biológicos celulares como la transcripción, la reparación del ADN y el ciclo celular. Durante la carcinogénesis del cáncer de mama, se producen una variedad de alteraciones genéticas, que incluyen mutaciones, variaciones en el número de copias, reordenamientos cromosómicos y aneuploidías. Estas alteraciones se acompañan de cambios epigenéticos que cooperan especialmente en el silenciamiento de supresores tumorales o activación de oncogenes que alteran diferentes vías de señalización involucradas en cáncer (Thuy *et al.*, 2017).

Las modificaciones epigenéticas son de gran interés en la investigación sobre el cáncer de mama, ya que afectan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Las células cancerosas tienen aberraciones en los mecanismos epigenéticos que incluyen la hipometilación global (menor grado metilación), hipermetilación (mayor grado de metilación) en promotores específicos, desregulación de microRNAs, desacetilación de histonas y modificaciones en la regulación de la transcripción, que conducen a la adquisición de características distintivas de las células cancerosas definidas por Hanahan y Weinberg (Hanahan 2022).

2.1.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN está involucrada en la herencia fenotípica en organismos unicelulares, así como en la herencia transgeneracional en organismos multicelulares y regula muchos procesos biológicos importantes como el desarrollo embrionario, la diferenciación y ciclo celular, la impronta genómica, el silenciamiento de elementos repetitivos y transponibles para mantener la estabilidad del genoma y la expresión de genes tejido específico (Zhou *et al.*, 2021).

El mecanismo de metilación consiste en la transferencia de un grupo metilo (-CH₃) desde un grupo donador, el S-adenosil-L-metionina (SAM) al carbono cinco del anillo de pirimidina de citosinas que se ubican en dinucleótidos con posición 5' CpG 3' y es un proceso catalizado por las ADN metiltransferasas (DNMTs) (Zhou *et al.*, 2021).

En el genoma, los dinucleótidos CpG se distribuyen asimétricamente, sin embargo, estos tienden a encontrarse agrupados en regiones del genoma denominadas islas CpG que poseen un contenido mayor al 50% de CG y tienen una longitud de entre 200 pb a 1000 pb; curiosamente, el 70% de los genes anotados están asociados en su región promotora a islas CpG que suelen estar desmetiladas manteniendo un patrón similar a lo largo de todo el genoma. Sin embargo, se han descrito patrones de metilación que permiten distinguir entre regiones diferencialmente metiladas de tejido normal (T-DMRs), tejido específico de cáncer (C-DMRs) y regiones diferencialmente metiladas asociadas a reprogramación (R-DMRs) (Greenberg *et al.*, 2019; Skvortsova *et al.*, 2019). Ambos tipos de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) flanquean las islas CpG río arriba y río abajo y reciben el nombre de shores si se localizan inmediatamente en las siguientes 2kb de las islas y shelves si están en las 2kb a continuación de las shores. La particularidad de estas regiones es que presentan patrones de metilación de diferente densidad al de las islas a lo largo de todo el genoma y se ha sugerido podrían dar más información del estado de expresión de un gen ya que estas podrían regular la propagación de metilación a las islas CpG (Skvortsova *et al.*, 2019).



Figura 6. Representación de las islas CpG, shores y shelves en una secuencia en el genoma (Clausen 2020).

2.1.1.1 Escritores, lectores y borradores de marcas de metilación de ADN

Durante la metilación del ADN, una familia de enzimas conocidas como ADN metiltransferasas (*DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT3L*) metilan el ADN genómico, las *DNMT3A* y *DNMT3B* realizan metilación *de novo* agregando los grupos

metilo a CpG no metilado, estableciendo así un nuevo patrón de metilación, mientras que la DNMT1, tiene preferencia por el ADN hemi-metilado y se encarga del mantenimiento de patrones de metilación después de la replicación del ADN en la hebra recién sintetizada en el ciclo celular (Skvortsova *et al.*, 2019, Heredia *et al.*, 2023)

La DNMT3L no posee actividad catalítica, pero actúa como un factor estimulante de la actividad de DNMT3A y DNMT3B. Por otra parte, las enzimas de la familia de diez-once translocasas (TET 1/2/3) pueden actuar eliminando las marcas de metilación del genoma mediante su actividad de metilcitosina dioxigenasa, en un proceso donde estas enzimas median una oxidación secuencial de la 5-metilcitosina (5mC) que resulta en la producción de varios grupos intermedios (5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxicisina) que pueden ser reconocidos y escindidos por la timina DNA glicosilasa (TDG) y por mecanismos de reparación por escisión de una base para finalmente reemplazarlos por una citosina no metilada (Skvortsova *et al.*, 2019, Zhou *et al.*, 2021).

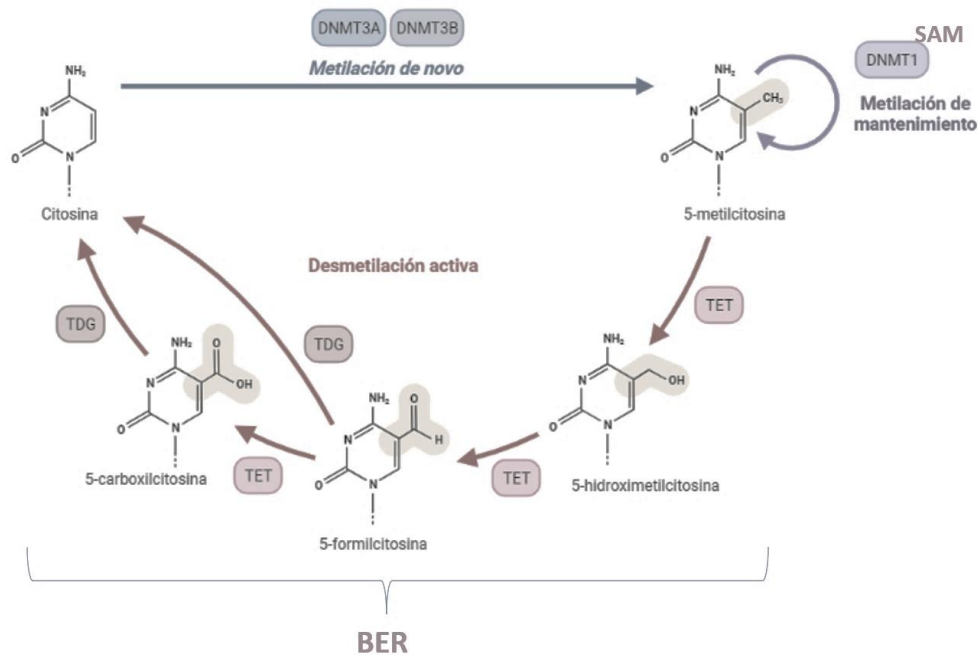


Figura 7. Escritores y borradores de la metilación del ADN. Figura realizada en Biorender.

Existen otras proteínas y complejos proteicos que actúan como lectores de las marcas de metilación y que pueden regular la expresión génica mediante dos mecanismos principales: en el primero, los residuos de la 5-metilcitosina sirven como barrera física

para el reconocimiento de secuencias consenso de factores de transcripción como Sp-1, *c-myc*, *CREB/ATF*, *E2F*, y *NF-kB*, de esta forma la metilación del ADN bloquea su unión y con ello disminuyen su actividad transcripcional (Shi *et al.*, 2021). El segundo mecanismo, implica el reclutamiento de proteínas del dominio de unión al ADN metilado (MBD) a citosinas metiladas en promotores, esto se debe a que la metilación del ADN se considera un paso inicial para el establecimiento de la cromatina inactiva, esto debido a que la asociación de sitios metilados con proteínas MBD permite el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs) o metiltransferasas de histonas que introducen marcas represivas por modificaciones en las histonas y también promueve el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina que contribuyen al compactado de la cromatina y en conjunto median el silenciamiento génico (Loeza *et al.*, 2020, Shi *et al.*, 2021).

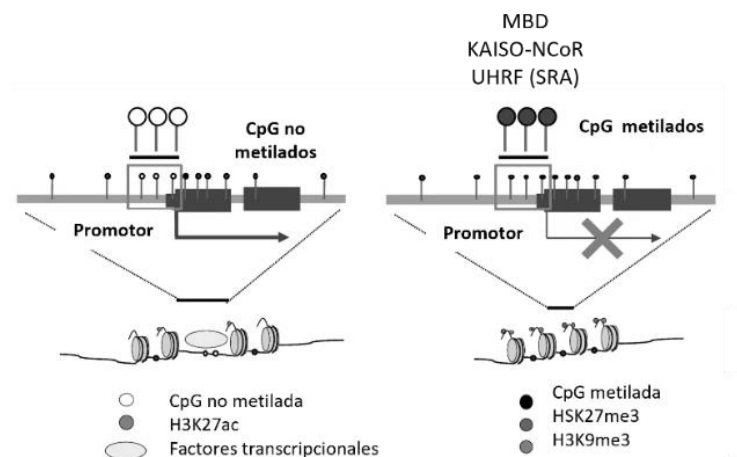


Figura 8. Representación de los mecanismos de silenciamiento génico por metilación del ADN. Figura realizada en Biorender.

Las MBD como *KAISO*, *UHRF* o *N-CoR* reclutan complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP como *SWI/SNF*, *ISWI*, *NuRD/Mi-2/CHD* y *INO80*, complejos modificadores de histonas que contienen HDAC como el complejo NurD e histonas metiltransferasas (HMTasas) a los promotores, lo que da como resultado una configuración de cromatina inactiva alrededor de los genes objetivo (Shi *et al.*, 2021).

2.1.2 Metilación aberrante del ADN

En un estado fisiológico normal, patrones de metilación del ADN se distinguen por su

correlación con la estructura de la cromatina, regiones activas que permiten la expresión génica se asocian con el ADN hipometilado, mientras que el ADN hipermetilado se asocia a cromatina inactiva.

Se sabe que la hipermetilación del ADN en regiones reguladoras como promotores y potenciadores puede silenciar la expresión génica de supresores tumorales que participan en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA, metabolismo de carcinógenos, interacciones célula-célula y apoptosis, recalcando la existencia de una correlación inversa entre la expresión génica y la metilación del ADN en los promotores. Por su parte, el aumento del nivel de hipometilación de todo el genoma da como resultado una mayor inestabilidad cromosómica y la activación de secuencias de ADN reguladoras de la transcripción de oncogenes, retrotransposones, la hipometilación de secuencias satélite metiladas (como LINE, SINE, IAP y elementos Alu) y genes que codifican proteínas involucradas en el desarrollo de células malignas (Loeza *et al.*, 2020).

2.1.3 Metilación aberrante en cáncer de mama

En el cáncer de mama humano se han observado patrones de metilación aberrantes del ADN, como hipermetilación de genes supresores tumorales e hipometilación global. Durante los últimos años, se han desarrollado métodos que proporcionan una imagen completa del estado de metilación de todo el genoma que incluyen: secuenciación con bisulfito de sodio, inmunoprecipitación del ADN metilado (MeDIP) seguida de hibridación con matrices de oligonucleótidos de alta densidad o secuenciación de próxima generación y microarreglos que miden el estado de metilación de sitios CpG bien caracterizados (Szyf 2012).

Existen reportes de genes cuyos promotores se metilan de forma aberrante en el cáncer de mama: ciclina D2 (CCND2) que regula el ciclo celular, el gen p16ink4A/CDKN2A que expresa un regulador del ciclo celular, el gen de la cadherina-3 (CDH3) que codifica para una molécula de adhesión celular significativo para la invasión y metástasis, el factor High in normal-1 (*HIN1*) inhibidor del crecimiento celular, la migración e invasión y los genes típicos del cáncer de mama como ER- α , ER- β y *BRCA*

1. Recientemente, se ha observado que el patrón metilación puede cambiar significativamente desde lesiones preinvasivas hacia la invasión del tejido circundante y la metástasis en cáncer de mama, lo que proporciona información sobre la progresión y el microambiente tumoral (Szyf 2012, Kumar *et al.*, 2019)

Varios investigadores han reportado diferentes genes con patrón de metilación aberrante característicos de los hallmarks en el cáncer de mama, es lo que respecta a invasión y metástasis, por ejemplo, Jing *et al* y Zurita *et al*, asociaron la metilación aberrante de SNF con metástasis en los ganglios linfáticos. Matuschek *et al*, encontraron que *APC* y *RASS-F1A* estaban metilados diferencialmente en enfermedad metastásica versus no metastásica.

Van der Auwera *et al*, reportaron a los genes *APC*, *RASSF1A*, *ER* hipermetilados células tumorales circulantes en sangre de pacientes con cáncer de mama metastásico. Mehrotra *et al*, reportaron que existe un mayor nivel de metilación de *CCND2*, *RARB*, *TWIST1*, *RASS-F1A* y *HIN-1* en tumores metastásicos en ganglios linfáticos. Nass *et al*, identificaron patrones de metilación diferenciales durante la progresión maligna del cáncer mama en los genes *ER* y *CDH1*, evidenciando cambios antes de la invasión, especialmente, en lesiones metastásicas. Lehman *et al*, analizó el estado de metilación de 4 genes reguladores del crecimiento *CDKN2A*, *RASS-F1A*, *CCND2* y *SNF*, reportando un mayor nivel de metilación de ellos en tumores invasivos respecto a no invasivos. Por último, Hoque *et al*, investigó el patrón de metilación del promotor de islas CpG durante la progresión del cáncer de mama ductal, así pues, identificó metilación aberrante en lesiones preinvasivas e invasivas para los genes *APC*, *CDH1*, *β-Catenina 1*, *TIMP3*, *ER*, *E-Cadherina* y *GSTP1*.

Con estos datos, se corrobora que el patrón de metilación del ADN es específico y cambia entre subtipos y etapas de la progresión del cáncer de mama, en donde se afectan en conjunto establecen un fenotipo particular del cáncer y lo que permite generar modelos de regulación epigenética en donde se deben integrar las modificaciones de la cromatina y las modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas.

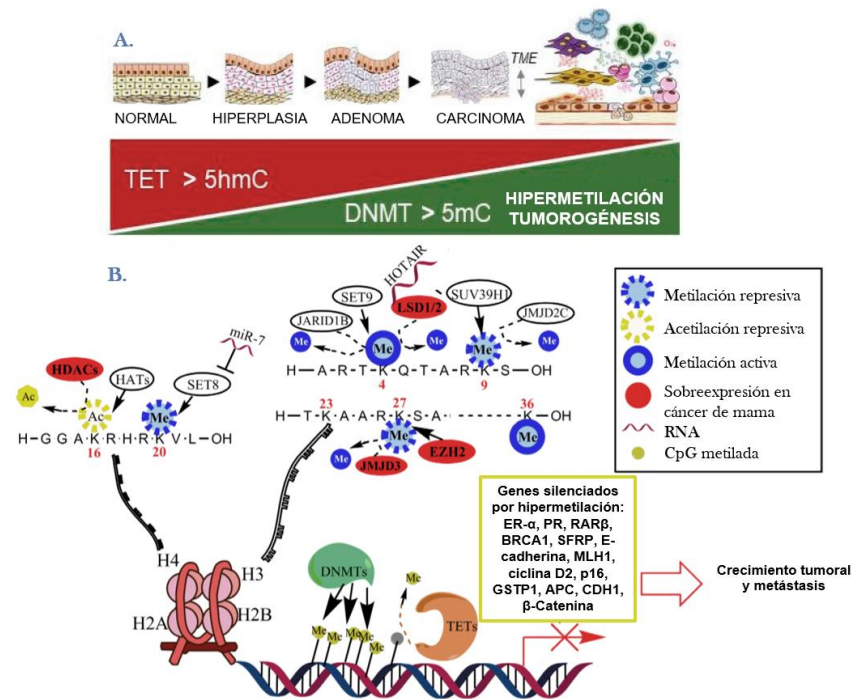


Figura 9. Modelo propuesto de regulación epigenética en el cáncer de mama. Imagen tomada y modificada de Katz., *et al* 2014.

A) Durante el desarrollo del cáncer de mama se observan patrones aberrantes de metilación por fallos en la actividad de las DNMTs y mutaciones en las TET, las interacciones entre las células tumorales y el microambiente generan los diferentes fenotipos observados a lo largo de la progresión tumoral. B) Las marcas de metilación del ADN son una plataforma de interacción para complejos remodeladores de la cromatina y complejos modificadores de proteínas que en conjunto median la regulación de la expresión génica. Una multitud de enzimas funcionan para metilar (HMT: Set8, Set9, EZH2), desmetilar (KDM: JARID1B, LSD1 / 2, JMJD2C, JMJD3), acetilar (HAT) o desacetilar (HDAC) histonas. La metilación aberrante del ADN se asocia a la represión de la transcripción, así, la hipermetilación en el promotor de un gen asociado a modificaciones de histonas anormales y a un estado de mayor compactación de la cromatina en las células de cáncer de mama conduce a la pérdida anómala de genes importantes para detener el crecimiento tumoral. Los genes más comúnmente afectados por metilación aberrante en cáncer de mama son el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor de ácido retinoico- β (RAR β), *BRCA1*, *SFRP*, E-cadherina, *MLH1*, ciclina D2, *p16*, *GSTP1*, *APC*, *CDH1*, β -Catenina (Katz *et al.*, 2014).

2.2 Cultivos celulares organotípicos en tres dimensiones (3D)

La mayoría de las células animales aisladas pueden vivir, multiplicarse y preservar ciertas propiedades al ser cultivadas en placas de plástico con medios de cultivo adecuados.

Tradicionalmente, el cultivo de células adherentes en dos dimensiones (2D) en monocapa que crecen adheridas a una superficie es el más empleado para el estudio de la biología del cáncer, sin embargo, presenta ciertas limitaciones para recrear fielmente el microambiente y los procesos moleculares de los tumores *in vivo*, razón por la que, se ha propuesto el uso de métodos de cultivo 3D que permitan optimizar las condiciones de cultivo para recrear mejor ciertas características biológicas y moleculares de un tumor *in vivo* tales como: interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, heterogeneidad celular, cinética de crecimiento diferencial, desarrollo de diferentes gradientes en el microambiente y de esta manera, las células reciban estímulos del ambiente local resultando en un cambio en la actividad de vías de señalización, metabolismo, expresión génica y alteración del patrón epigenético que incluye la metilación del ADN (Heredia *et al.*, 2023; Katt *et al.*, 2019).

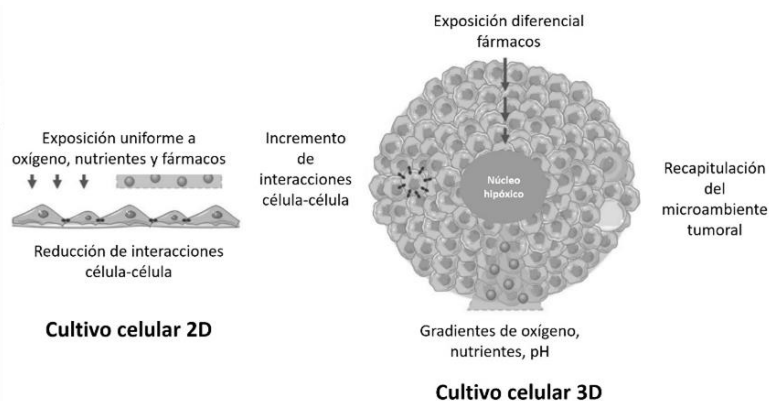


Figura 10. Comparación del cultivo en monocapas y cultivo en 3D (Fontana *et al.*, 2020).

Todas estas características proporcionan una mayor precisión y sensibilidad para el estudio de las células tumorales y cómo el microambiente influye en su crecimiento. Los sistemas de cultivo celular 3D se basan en la utilización de andamios sólidos naturales o artificiales (organotípicos) o sistemas sin andamios (esferoides) que se cultivan en suspensión sobre sustratos plásticos (Ko *et al.*, 2018).

En cultivos organotípicos 3D, las células se cultivan sobre soportes semisólidos (como hidrogeles o materiales poliméricos de origen animal o vegetal) para crear estructuras similares a tumores.

Los hidrogeles como la Matrigel que son hechos a base de colágeno con proteínas como laminina, proteoglicanos y glicoproteínas son los más utilizados en este tipo de metodologías debido a sus propiedades mecánicas, que pueden reconstruir una estructura similar a la matriz extracelular nativa; sumado a esto, la presencia de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que pueden integrarse en este tipo de cultivo, hace que dicha metodología sea muy adecuada para recapitular fácilmente muchos aspectos de la fisiología de los tumores como las interacciones célula-célula, célula-MEC, polarización y morfología celular, así como los gradientes de nutrientes, pH y oxígeno que se observan en los tumores *in vivo* (Ko *et al.*, 2018; Fontana *et al.*, 2021).

2.2.1 Tipos de morfología de cultivos en 3D

De acuerdo con el microambiente, las células tumorales responden de manera distinta a factores como la quimioterapia, supervivencia, crecimiento, invasión y metástasis, evidenciando así, la existencia de diferencias morfológicas y bioquímicas entre células tumorales cultivadas en 2D y 3D. Kenny y colaboradores, descubrieron en 2007 cuatro clases morfológicas distintas de células de cáncer de mama cultivadas en 3D (redonda, en masa, racimo de uva y estrellado), correlacionadas con patrones de expresión génica y proteica latentes (Figura 11).

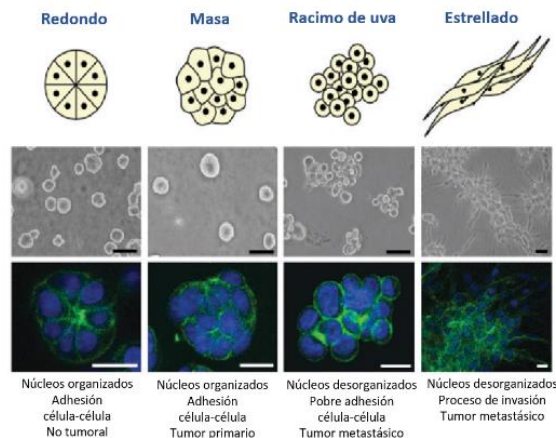


Figura 11. Las morfologías de colonias de líneas celulares de mama en cultivo 3D. Imagen tomada y modificada de Kenny *et al.*, 2007.

Dentro de la clase tipo masa, encontramos a las líneas celulares BT-474, MCF-7 y T-47D que forman colonias con núcleos desorganizados. La clase de células redondas incluye las líneas celulares HCC1500, MCF-12A y S1, que forman colonias redondas en la parte superior de los cultivos en 3D, con núcleos organizados regularmente. La clase de células tipo racimo de uva incluye las líneas celulares SK-BR-3, ZR-75-1 y ZR-75, forman colonias con malos contactos célula-célula y tienen apariencia de uva. Por último, la clase de células tipo estrellado, incluye las líneas celulares BT-549, Hs-578-T, MDA-MB-231 y MDA-MB-436, presentan un fenotipo invasivo en cultivo 3D con proyecciones estrelladas que regularmente unen múltiples colonias celulares. En este trabajo se usaron las líneas celulares SK-BR-3, BT-474 y Hs-578-T (HER2+, luminal y triple negativo, respectivamente) (Kenny *et al.*, 2007).

Respecto a los estudios epigenéticos de cáncer usando métodos de cultivo en 3D, es muy poca la información reportada, centrándonos en metilación del ADN se ha reportado que este mecanismo está influenciado por factores microambientales como las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular en el contexto de los tejidos, y que esto conduce a la alteración de los perfiles de metilación silenciando o sobreexpresando genes, resulta entonces importante recalcar el uso de modelos de estudio que se acerquen a la realidad de lo que ocurre en la tumorigénesis, por ejemplo, E-cadherina, juega un papel muy importante en los procesos de diseminación y adquisición de un fenotipo migratorio que depende de la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales. La expresión de este gen se desregula en cáncer, sin embargo, existen diferencias consistentes que apuntan a que E-cadherina generalmente se silencia por hipermetilación del promotor en cultivos 2D; mientras que en cultivos 3D se vuelve a expresar por hipometilación a nivel promotor. Esto da sentido a la necesidad de que las células lleven a cabo metástasis para restablecer las adherencias medidas por E-cadherina para revertir el fenotipo migratorio y permitir la formación de nichos premetastásicos (Langhans *et al.*, 2018).

Curiosamente, también se han analizado los niveles y la actividad de las DNMTs y se ha sugerido que proteínas como la laminina-1 y varios microARN inhiben su actividad en cultivos 3D. Es posible, entonces, que la metilación del ADN en los tumores esté alterada debido a procesos relacionados con los microARN, que también pueden estar regulados por hipo e hipermetilación. Por otro lado, se ha investigado en células madre de cáncer que la metilación del ADN tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes como *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *KLF4* informando cambios significativos en la expresión génica cuando las células están cultivadas en una condición 2D y 3D; los resultados obtenidos con respecto a los patrones de metilación alterados en cultivos celulares en 3D fueron más comparables con los análisis basados en tejidos (Huang *et al.*, 2020; Ondeck *et al.*, 2019; Stowers *et al.*, 2019).

Los procesos epigenéticos son muy complejos y cómo el microambiente participa en la regulación de estos sigue siendo un tema muy importante a investigar, por lo anterior resulta importante encontrar cultivos que sean más optimizables para reflejar la heterogeneidad intramural *in vivo* y que permitan obtener resultados más confiables respecto a vías de señalización alteradas y procesos moleculares afectados que sean una oportunidad de estudio para el mejoramiento de tratamientos contra el cáncer.

2.3 Modelos de xenotransplantes de cáncer

Junto con los modelos *in vitro*, los modelos *in vivo* con animales son una herramienta importante para el estudio y elucidación de la biología de cáncer, los modelos de xenotrasplantes de pez cebra tienen un enorme potencial para estudiar el comportamiento, la proliferación, las interacciones celulares de los tumores, la respuesta a fármacos y la invasión y metástasis (Astell *et al.*, 2019).

El modelo animal de pez cebra de xenotransplantes de cáncer es capaz de mantener la biología de tumores, puede predecir la eficacia de los fármacos en pacientes, las células implantadas en el pez pueden derivar de varios tipos de tumores como: células germinales, leucemia, linfoma, melanoma, sarcoma, neuroblastoma y varios cánceres epiteliales que se originan en el sistema neuroendocrino (es decir, hígado, tracto gastrointestinal, colon, páncreas, próstata, pulmón, ovario y mama) y estas células no

solo sobreviven, sino que también pueden migrar e interactuar con el entorno del huésped (Astell *et al.*, 2019; Gamble *et al.*, 2021).

Respecto a su aplicación, el pez cebra es un modelo de bajo costo de manutención y alto rendimiento, es de tamaño pequeño y puede incubar de 150 a 200 huevos en cada puesta semanalmente. Además, el proyecto del genoma del pez demostró que la conservación de secuencias de múltiples genes en otras especies incluido el ser humano, en este último se identificó que el 82% de los genes relacionados con enfermedades humanas son ortólogos, lo que sugiere una alta conservación entre vías moleculares del pez y el humano. Por si esto no fuera poco, las características físicas como la transparencia y el tamaño de los embriones los hace un sistema ideal para poder evaluar tumores y células implantadas mediante microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, biopsia patológica y otras técnicas (Gamble *et al.*, 2021).

Otras particularidades del pez es que no desarrollan sistema inmune adaptativo hasta después de los 15 días de su fertilización, también, aunque el pez cebra no es un mamífero, tiene varios tejidos, órganos y glándulas cuyas funciones son similares a las de los mamíferos; estos incluyen los sistemas musculoesquelético y cardiovascular, ojos, cerebro, hígado, corazón, tracto gastrointestinal y páncreas. También, a pesar de que el pez zebra prefiere una temperatura ambiental para su desarrollo de 28°C, es capaz de sobrevivir a temperaturas de 32 a 36 °C, más cercanas a las condiciones de cultivo de células humanas (Paatero *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2021).

El estudio de diferentes Hallmarks del cáncer puede llevarse a cabo en el pez cebra, la cascada metastásica y la invasión de células tumorales son procesos que se recrean fielmente en este organismo, desde la intravasación hasta la colonización para la formación de tumores secundarios a lo largo del cuerpo del pez pueden observarse, medirse y cuantificarse por metodologías que ya están bien descritas, además después de ser implantadas las células tumorales, los peces pueden mantener hasta 7 días lo que permite la realización de experimentos a distintos tiempos y la posibilidad de observar los fenotipos en cada una de las etapas de la metástasis (Paatero *et al.*, 2018).

3. Justificación

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en el mundo en la población femenina, desde el 2006 en México es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Se ha identificado que la acumulación de defectos tanto genéticos como epigenéticos influyen en distintos Hallmarks del cáncer durante el desarrollo y progresión de esta enfermedad. El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea que se caracteriza por diversos subtipos moleculares que son causados por defectos genéticos y en su mayoría por la interacción de factores ambientales y del estilo de vida.

Previamente se ha establecido que mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN es esencial para el correcto funcionamiento del organismo y que en cáncer existen perfiles de metilación aberrante del ADN lo que influye en la desregulación de genes que contribuyen a la invasión y metástasis que es uno de los hallmarks del cáncer más estudiados debido a que se le atribuyen el 90% de las muertes por cáncer. Sin embargo, son muy pocos los estudios usando modelos 3D organotípicos que poseen una mayor capacidad de reflejar fielmente lo que ocurre en un tumor *in vivo*, siendo más comunes los estudios en cultivos en monocapas (2D).

Esta investigación se centró en determinar el impacto del cultivo en 3D de líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3, BT-47-4 y Hs-578-T (HER2+, luminal B y triple negativo respectivamente) sobre el nivel de metilación global del ADN en sitios CpG, con el objetivo de identificar cambios en el perfil de metilación asociado a la expresión de genes que participen en los procesos de invasión y metástasis para cada una de las líneas celulares de estudio. Todo lo anteriormente mencionado nos permitió evidenciar cual es el método de cultivo idóneo para su estudio, además de, contribuir al entendimiento de la heterogeneidad biológica entre los diferentes subtipos de cáncer de mama mediante el uso de modelos de xenotrasplantes de cáncer y finalmente establecer perfiles de metilación específicos para cada línea celular con la posibilidad de encontrar dianas terapéuticas para tratamientos epigenéticos contra el cáncer.

4. Hipótesis

Los cultivos organotípicos en 3D inducen cambios significativamente diferentes respecto a los cultivos en 2D en los patrones de metilación del ADN de células de cáncer de mama modificando la expresión de genes que contribuyen a la invasión y metástasis.

5. Objetivos

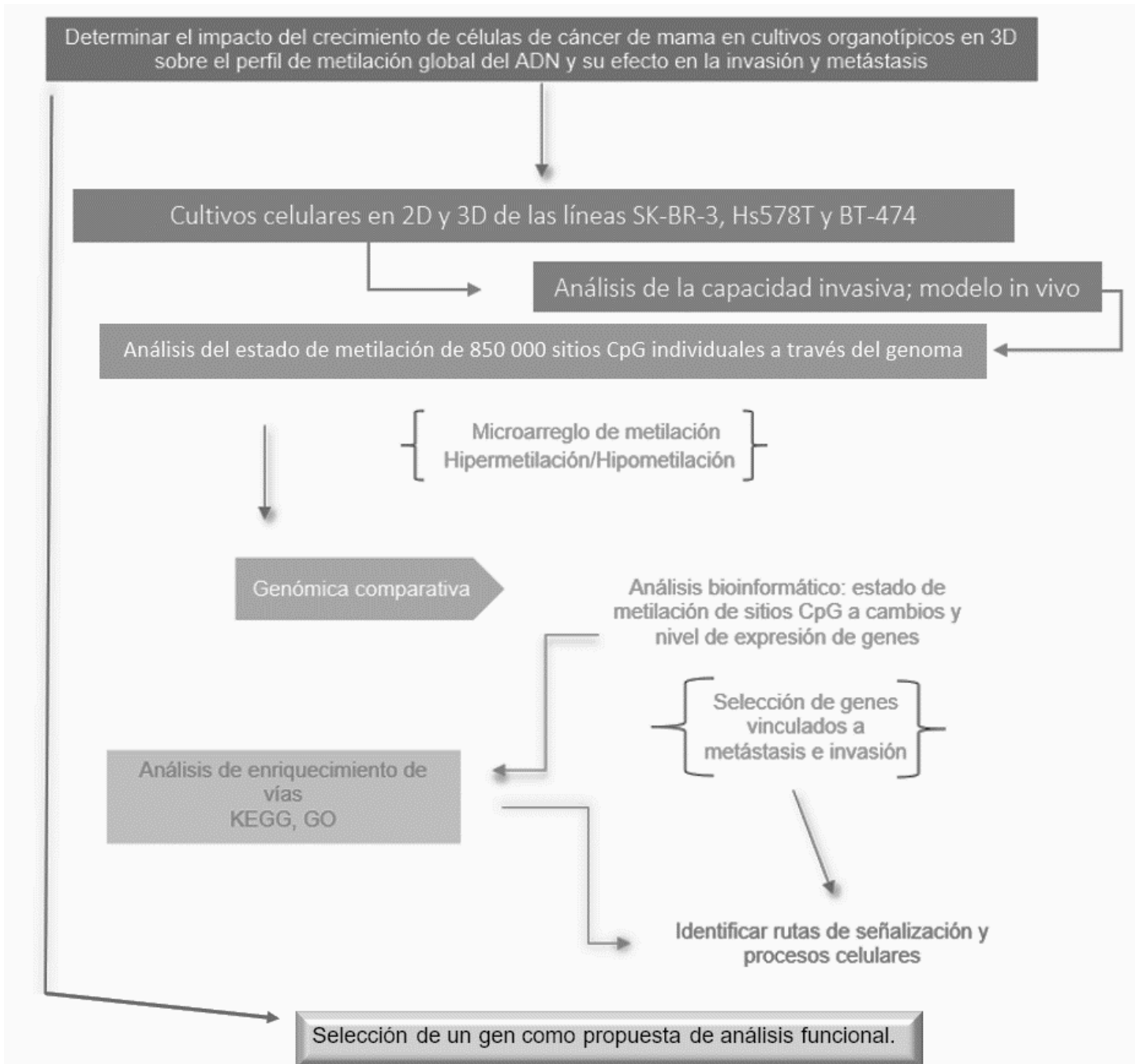
5.1 Objetivo general

Determinar el impacto del crecimiento de células de cáncer de mama en cultivos 3D organotípicos sobre el perfil de metilación global del ADN y su efecto en la invasión y metástasis.

5.2 Objetivos particulares

- a) Establecer el cultivo organotípico en 3D y el cultivo en monocapas 2D de células de cáncer de mama (Hs-578-T, SK-BR-3 y BT-474).
- b) Evaluar la capacidad de invasión y metástasis de los cultivos en 2D y 3D de células de cáncer de mama utilizando un modelo de xenotrasplantes: Danio rerio (pez cebra).
- c) Analizar el estado de metilación de 850 000 sitios CpG individuales a través del genoma de las células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D para identificar cambios en los patrones de metilación asociados a la expresión de genes involucrados en invasión y metástasis.
- d) Identificar las rutas de señalización y procesos celulares en los cuales participan los genes potencialmente modulados de manera epigenética asociados a invasión y metástasis.
- e) Identificar una firma de genes modulados por mecanismos epigenéticos asociados a invasión y metástasis en las líneas celulares de estudio y seleccionar un gen como propuesta de análisis funcional.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Establecimiento de cultivos de líneas celulares en 2D

Para este trabajo se usaron líneas celulares Hs578T, SKBR3 y BT-474 provenientes de tumores de glándulas mamarias, adherentes con morfología epitelial que corresponden a los subtipos moleculares triple negativo, HER2+ y luminal B respectivamente. Como paso previo al establecimiento de los cultivos organotípicos en 3D, las líneas celulares a usar se cultivaron primero en monocapas de la siguiente manera: la línea celular SK-BR-3 se mantuvo en medio McCoy's 5A (ATCC) que contiene L-glutamina 4mM, 4500mg/L de glucosa, piruvato de sodio 1mM (milimolar) y 1500mg/L de bicarbonato de sodio y se suplementó con 10% de suero fetal bovino, 0.01mg/mL de insulina humana y 1% de antibiótico-antimicótico. La línea celular BT-47-4 se mantuvo en medio RPMI 1640 (ATCC) que contiene L-glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM, glucosa 4500mg/L, HEPES 10mM y bicarbonato de sodio 1500 mg/L y se suplementó con 10 % de suero fetal bovino, 0.01mg/mL de insulina humana y 1 % de antibiótico-antimicótico. La línea celular Hs578T se mantuvo en medio DMEM F-12 que contiene L-glutamina 4mM, 4500mg/L de glucosa, piruvato de sodio 1mM y 1500mg/L de bicarbonato de sodio y se suplementó con 10% de suero fetal bovino, 0.01mg/mL de insulina humana y 1% de antibiótico-antimicótico. Las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono y cada tercer día el medio de cultivo se retiró y reemplazó hasta que los cultivos alcanzaron una confluencia del 75-85%.

Para el mantenimiento de las líneas celulares, primero se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con Buffer fosfato salino (PBS) 1x a pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS 1x pH 7.0-EDTA 6.8mM con tripsina al 0.25% (Gibco) y se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios, luego de esto las células se incubaron durante 5 min a 37 °C. Después de la incubación con tripsina se visualizaron las células en microscopio para observar si se disgregaron de la placa. Una vez disgregadas las células se les agregó 1mL de medio suplementado de manera correspondiente para cada línea celular y así inactivar la tripsina mezclando por pipeteo., las células despegadas se transfirieron a un tubo Falcón de 15mL y se

centrifugaron a 1300rpm (revoluciones por minuto) por 3min a 21°C. Al finalizar el paso de centrifugación, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1mL de medio de cultivo fresco debidamente suplementado según la línea celular y se distribuyeron en cajas nuevas de 75mm incubando nuevamente a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono y monitoreando su crecimiento hasta que alcanzaron una confluencia del 75 al 85% de y solo cambiando de medio (como se describió previamente) de ser necesario.

7.2 Establecimiento de los cultivos organotípicos 3D en Matrigel

La noche previa a realizar este ensayo, se debe descongelar el reactivo Geltrex o Matrigel (Gibco) a 4°C y se debe mantener a esta temperatura en hielo durante todo el ensayo para evitar solidifique.

Placas de cultivo de 24 pozos se recubrieron con una capa delgada de Matrigel, con volumen adecuado para las placas (120µl) y se incubaron por 30min a 37°C. Durante el tiempo en que las placas con Matrigel estaban en incubación, de manera simultánea las células previamente cultivadas en monocapas se tripsinizaron y se resuspendieron en un volumen de medio apropiado para placas de 24 pozos (250µl). Pasado el tiempo de incubación de las placas con Matrigel, las células resuspendidas en el medio apropiado se agregaron al pozo recubierto con Matrigel y se dejaron adherir incubando durante 30min a 37°C. Pasado el tiempo de incubación anterior, se hizo una mezcla de cada medio de cultivo con Matrigel al 5% y esta se agregó cuidadosamente al pozo correspondiente mezclando para homogeneizar.

Los cultivos se mantuvieron de 6 días hasta observar la formación de colonias con la morfología adecuada para cada una de las células (como previamente ya se había explicado) cambiando el medio suplementado con Matrigel al 5% cada 2 días.

7.2.1 Tinción fluorescente de células

Las células en cultivo 2D se tripsinizaron para obtener una concentración final de 2×10^7 células/mL y estas se lavaron con medio sin suero para que luego se centrifugaran por 3 min a 1200rpm, el pellet de células se mantuvo dejando solo aproximadamente 25µL de sobrenadante. Después, se preparó una suspensión 2X con 1mL de diluyente C y el pellet celular y se re-suspendió por pipeteo. A la suspensión anterior se le agrego

una solución (dye solution) mezclada por pipeteo que contenía 4 μ L del reactivo PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma) diluido en 1mL de diluyente C y se incubó por 5 min a temperatura ambiente mezclando de forma periódica por pipeteo. Después de la incubación, se agregó medio con suero para detener la reacción de tinción y se incubaron las células por 1 min, pasado este tiempo las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5min a 25°C desechando el sobrenadante. El pellet se re-suspendió en medio suplementado y se volvió a centrifugar, este paso se repitió 3 veces más para remover el dye que no se unió a las células. Después del último lavado, el pellet se re-suspendió en medio suplementado para obtener la concentración deseada, en nuestro caso: 1 000 000 de células en 200 μ L de medio.

Para las células cultivadas en 3D primero se llevó a cabo un paso de disgregación de la Matrigel posterior a la tinción fluorescente, primero se retiró el medio de los pozos de la placa de cultivo cuidadosamente y se les agregaron 250 μ L de PBS-EDTA 0.5mM frío y las placas se incubaron por 35min en hielo para permitir que la Matrigel se hiciera líquida. Pasada la incubación anterior se recolectó el contenido de cada pozo en tubos Falcón de 15mL y se centrifugaron a 1200rpm por 5min a 4°C, el sobrenadante se desechó. Se conservó el pellet con las células crecidas en 3D y se les agregaron 100 μ L del reactivo Acutase Cell Detachment Solution y se incubaron por 5min a 37°C para permitir la disgregación completa de los esferoides de la Matrigel, después un paso de centrifugación a 1200rpm durante 5min permitió la recuperación de los esferoides y el marcaje fluorescente se realizó de la manera previamente descrita.

7.3 Evaluación la capacidad de invasión y metástasis in vivo de células de cáncer de mama cultivadas en 3D y 2D

7.3.1 Mantenimiento general de los peces cebra

Los peces cebra adultos se mantuvieron en un sistema de acuario de peceras de 20L con la cepa TabWik donada por el Dr. Ernesto Maldonado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, unidad puerto Morelos. Las peceras contenían un sistema de filtro individual, el agua de los peces se mantuvo a un pH de 7.4 y a una temperatura constante de 28°C, con un ciclo de luz: oscuridad natural de

aproximadamente 11 a 13 horas. Los cuidados y alimentación de peces y embriones se siguieron de acuerdo con los procedimientos estándares descritos en “The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)”. Todos los experimentos y procedimientos en animales se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos del “THE INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) UNIVERSITY OF OREGON”. Desde 2016 el Instituto Nacional de Medicina Genómica cuenta con un acuario de peces cebras para investigación, que se usa para el modelado de xenotransplantes de líneas celulares *in vivo* del cáncer humano para diferentes proyectos en los laboratorios del Dr. Jorge Meléndez y de la Dra. Vilma Maldonado. En el Laboratorio de Genómica funcional de Cáncer se cuenta con un sistema de microinyección manual de peces cebras e incubadoras para el mantenimiento de embriones, así mismo, se ha establecido un comité de ética y manejo de animales de laboratorio, todos los procedimientos en los peces respetaran los lineamientos establecidos por dicho comité.

7.3.2 Metodología de xenotrasplantes

Se obtuvieron embriones a partir de cruces naturales de peces cebras sexualmente maduros de la cepa TabWik (un macho con dos hembras), después de la reproducción, las larvas se recolectaron e incubaron a temperatura ambiente en agua de acuario hasta los dos días post fertilización, haciendo un cambio de agua a las 24 hpf (horas post-fertilización) y separando aquellos embriones que no lograron su desarrollo. Para la microinyección del ensayo de migración, se usaron 40 embriones de pez cebras de 48 hpf (10 embriones para control negativo sin inyección y 30 embriones para inyección de suspensiones con 250 células por línea celular). El conteo de las células a inyectar se realizó en un microscopio óptico: en capilares de vidrio de borosilicato (aguja) con un setting de 3.55 volts y 0.85 amperes se cargaron 10-20nL (nanolitros) de la suspensión de células previamente teñidas y se procedió al conteo. Los peces de 48 hpf se decorionaron y anestesiaron con triclaína al 0.02% (Sigma) y se colocaron en una cama de agarosa de bajo punto de fusión con surcos para mantenerlos fijos y poder observarlos al microscopio.

La introducción de las células se realizó mediante un pulso de gas Nitrógeno utilizando la aguja de borosilicato cargada con las suspensiones celulares correspondientes y

conectada a un microinyector neumático (PLI-100, Warner Instruments) en medio de la región del saco vitelino embrionario. La capacidad migratoria se evaluó al cabo de 24hrs posteriores a la inyección de las células por microscopía de epifluorescencia (Microscopio óptico ZEISS Axioscope) dentro del cuerpo de los embriones. La capacidad migratoria se determinó contabilizando el número de células fluorescentes fuera del sitio de inyección con el software ImageJ (Thresholding y enmascarado en imágenes). Este procedimiento se realizó para células crecidas en 2D y 3D.

Los datos del conteo del número de células que migraron fuera del sitio primario de inyección se usaron para hacer histogramas de frecuencia y determinar el número de células que migraron en una condición de cultivo y otra, también se realizó un análisis comparativo con una estadística de ANOVA de una sola vía para determinar si había diferencias significativas entre en número de células que migraron cuando fueron inyectadas de una condición en 2D y 3D, este análisis se realizó para cada una de las líneas celulares de estudio.

7.4 Análisis del estado de metilación de 850 000 sitios CpG individuales a través del genoma de las células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D

7.4.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

De los cultivos organotípicos en 3D y en monocapas 2D previamente bien establecidos, se realizó la extracción de ADN genómico con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), que fue necesario para el ensayo de análisis del estado de metilación de sitios CpG individuales a través del genoma con microarreglos de metilación.

Las células cultivadas en monocapa a una confluencia del 80 a 90% se tripsinizaron como se describió previamente y se centrifugaron en tubos para microcentrífuga de 1.5mL para resuspenderlas en medio sin suplementar dejando solo de 10 a 15µL de solución, el pellet obtenido se lavó con 200µL de PBS 1x resuspendiendo las células por vórtex vigoroso durante 20seg. Las células se centrifugaron durante 3 min a 1300 rpm para quitar el PBS, el pellet se conservó descartando el sobrenadante y se le

agregaron 600µL de la solución de lisis de núcleo mezclando por pipeteo. Luego se agregaron 3µL de la solución de RNAsa a la mezcla de células lisadas y se mezcló por inversión 5 veces, esta mezcla se incubó por 30min a 37°C en un termobloque, pasada esta incubación se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente por 5min. Luego se agregaron 200µL de la solución de precipitación proteica y se dio in vórtex vigoroso por 20seg para después incubar la muestra en hielo por 5min y pasado este tiempo se centrifugó por 4min a 11000 rpm. El sobrenadante se removió de manera cuidadosa y se transfirió a un tubo limpio que contenía 600µL de isopropanol puro a temperatura ambiente y se mezcló por inversión 5 veces. La mezcla se centrifugó a 11000rpm y se desechó el sobrenadante conservando el pellet que después se resuspendió en 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente mezclando por inversión 10 veces para lavar el ADN. La mezcla se centrifugó 5min a 11000rpm a temperatura ambiente y luego el etanol se aspiró cuidadosamente, el tubo con el ADN se invirtió sobre papel absorbente y se dejó 15 min para permitir que el etanol restante se evaporara. El ADN se rehidrató con 100µL de solución de rehidratación (10mM Tris-HCl pH 7.4 y 1mM EDTA pH 8.0) incubando por 1hr a 65°C en un termobloque y mezclando periódicamente a golpes suaves. El DNA se dejó a 4°C toda la noche y después se etiquetó y almacenó a -20°C. Para la extracción de ADN de los cultivos en 3D se siguió el procedimiento de disgregación descrito anteriormente con el reactivo acutase y adicionalmente a este procedimiento, las células fueron pasadas 4 veces por jeringas de insulina después de agregar la solución de lisis de núcleo del kit para su correcta lisis, después se siguió con el mismo procedimiento aquí descrito para la extracción de ADN genómico.

7.4.2 Cuantificación y análisis de la integridad del ADN genómico obtenido a partir de cultivos celulares en 2D y 3D

Para cuantificar el ADN obtenido a partir de las extracciones realizadas, se usó un nanoespectrofotómetro (Nanodrop Lite Thermofisher) que permitió medir el espectro UV-Vis tomando en cuenta los valores de la relación de absorbancia a 260/280 y 260/230 a partir de volúmenes de 1µl. Para evaluar la integridad de nuestras muestras de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa: el gel se preparó al 0.7% de agarosa, 50ml de TBE con 0.7µl de SYBR Safe. La preparación de las muestras se realizó con 2µl de buffer de carga mezclado con 2µl de las muestras de ADN. Una vez

mezcladas las muestras, se procedió a depositar cada una en su pozo correspondiente en el gel de agarosa. La cámara de electroforesis se ajustó a 50V y el corrimiento fue por 1hr. Después se procedió a realizar el análisis del gel de agarosa en un fotodocumentador ajustando las condiciones de lectura para ADN de doble cadena y filtro de emisión para SYBR Safe.

7.4.3 Análisis del estado de metilación de sitios CpG individuales a través del genoma con microarreglos de metilación

Para interrogar el genoma e identificar los sitios metilados diferencialmente en cada una de las células a analizar, se usó el microarreglo de metilación Infinium MethylationEPIC BeadChip de la compañía Illumina (número de catálogo 20042130), el cual permitió la interrogación de 866 895 sitios CpG en todo el genoma humano. El ensayo de metilación Infinium detecta la metilación de citosina en islas CpG basándose en la genotipificación de ADN genómico convertido con bisulfito, en el que las bases de citosina no metiladas se convierten en uracilo, mientras que las bases de citosina metiladas permanecen sin cambios. La matriz usa una sola perla por sonda que puede caer en uno de los dos canales que posee el microarreglo; un canal rojo o verde que representa si un sitio está o no metilado, respectivamente. Fue necesario tener 1800 ng de DNA genómico para cada una de las muestras que se mandaron analizar. El portaobjetos con la matriz se escanea con un escáner (Iscan, Illumina) y cada imagen se analizó con el software GenomeStudio de la compañía Illumina para analizar la metilación del ADN a escala de todo el genoma.

El departamento de secuenciación y microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) fue el encargado de realizar este análisis.

Análisis bioinformático del estado de metilación de sitios CpG de cultivos en 2D y 3D
Los datos de la matriz de metilación: MethylationEPIC BeadChip se nos entregaron en un formato llamado IDAT, el cual contiene valores de señal fluorescente, estos archivos se procesaron con el software GenomeStudio para poder cuantificar el nivel de metilación en los sitios analizados y así obtener los valores β que representan el estado de metilación de un sitio CpG específico. Primero en el programa GenomeStudio se

abrieron los archivos IDAT y se creó un nuevo proyecto seleccionando el apartado de metilación, después de esto el programa arrojó una base de datos que contenía valores AVGB (promedio de valores β) que son un promedio ponderado de las intensidades de señal para cada uno de los sitios CpG analizados, así pues, se obtuvieron los valores β van de 0 a 1, donde 0 es un sitio completamente desmetilado y 1 es un sitio completamente metilado. Con estos datos se generaron gráficos de densidad que nos permitieron ver cómo fue el comportamiento de nuestros datos entre las diferentes condiciones de cultivo y líneas celulares.

Después en con el mismo programa y seleccionando la herramienta de análisis de metilación diferencial, se pudo obtener las diferencias en el nivel de metilación de los diferentes sitios CpG para cada línea celular comparando la metilación de cultivo en 2D y 3D y de esta forma se obtuvieron las listas de genes asociados a los sitios CpG metilados diferencialmente que se exportaron en formato CSV y sirvieron para los análisis posteriores.

Para todas las muestras, un sitio CpG con diferencia de metilación $|\Delta\beta| > 0.1$ y un valor de $P < 0.01$ se consideró como sitio diferencialmente metilado (DMS), así entonces, $\Delta\beta > 0.1$ se consideró un sitio hipermetilado y $\Delta\beta < -0.1$ se consideró un sitio hipometilado.

7.4.4 Validación del microarreglo de metilación

La validación de nuestro análisis por microarreglos de metilación se realizó mediante PCR con ADN convertido con bisulfito de sodio, usando oligonucleótidos de metilación dirigidos a regiones promotoras hipermetiladas de algunos genes interrogados por el microarreglo. Para esto se realizaron los siguientes procedimientos.

7.4.4.1 Diseño de oligonucleótidos para sitios CpG en promotores

Los oligonucleótidos se diseñaron para las islas CpG hipermetiladas contenidas en la región promotora de los genes: FAT4, BRMS1M, FUT5, PLAU, BRMS1L, RECK y RASS-F1A usando la herramienta en línea MethPrimer especificando el tamaño no mayor a 1000pb de la isla CpG.

Primer	Longitud	Secuencia 5'-3'
FW-PLUA	24	GGTTAGGTGTATGGGAGGAAGTAC
RV-PLUA	22	CTATCTTACAACGCTCAACGAC
FW-FUT6	25	TGAGGTAGGAGAATGGTATGAATTC
RV-FUT6	24	TTTAAACGAAATCTCCCTCTATCG
FW-BRMS1L	25	AGTTTGGGTAATAAGGTGAAAATTC
RV-BRMS1L	25	TCGAATACAATAATACAATCACGAC
FW-RASSF1	25	TATTTTTTCGATTTGGAGTTTTTTC
RV-RASSF1	25	CTACACTATAACCTACCCATCCTCG
FW-FAT4	23	GTTTCGCGGAGTTTTAGTTTTATC
RV-FAT4	23	TCTCTCCTTACAATTAACAACG

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía IDT, México.

7.4.4.2 Conversión del ADN genómico con bisulfito de sodio

Se extrajo ADN genómico con la metodología antes aquí mencionada de células cultivadas en 2D y 2D y se utilizó para realizar una conversión con bisulfito de sodio con el kit Epimark Bisulfite Conversion de New England Biolabs (No. de catálogo SE3318S). Esta es una de las técnicas más usadas para el análisis de metilación, durante la reacción el ADN y el bisulfito de sodio se incuban y alternan ciclos de desnaturalización térmica dando como resultado la conversión de todas las citosinas no metiladas en uracilos y dejando intactas las bases modificadas por metilación del ADN (5mC o 5 hmC). Se utilizaron 500 ng de ADN producto de extracción de cultivos en 3D y 2D para todas las líneas celulares aquí estudiadas. Se prepararon reacciones en microtubos de PCR con 10µl de ADN genómico con una concentración de 50ng a 2µg y 130µl del Mix de Bisulfito de sodio para obtener un volumen total de reacción de 140µl, luego se procedió a incubar la mezcla en un termociclador marca Gene Amp PCR Systems 9700 como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de PCR para la conversión de ADN con bisulfito de sodio

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5min
Incubación	65°C	30min
Desnaturalización	95°C	5min
Incubación	65°C	60min
Desnaturalización	95°C	5min
Incubación	65°C	90min
Mantenimiento	18-20°C	12hrs

Después de haber transcurrido las 12 horas de mantenimiento, se procedió a realizar la reacción de desulfonación y limpieza de la muestra. Las reacciones se transfirieron

a tubos de microcentrífuga de 1.5ml, y se agregaron 550µl de tampón de unión de ADN y se mezcló por pipeteo. Después, la mezcla se transfirió a una columna giratoria EpiMark con un tubo de recolección de 2ml y se procedió a centrifugar las columnas a 15.000 x g durante 1min y se desechó el residuo. Después se agregaron 500µl de tampón de lavado y las muestras en la columna se centrifugaron 15 000 x g durante 1min y desechó el residuo. Luego de esto, se agregaron 500µl de tampón de reacción de desulfonación a cada columna y se incubaron a temperatura ambiente (18–20°C) durante 15 min en un termobloque. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las columnas a 15.000 x g durante 1min y se desechó el residuo y se agregaron 500µl de tampón de lavado, seguido de esto se centrifugaron las columnas a 15 000 x g durante 1min y se desechó el residuo. Este paso se repitió dos veces más. Después, se centrifugaron las columnas a 15 000 x g durante 1min para eliminar cualquier tampón de lavado residual de las columnas de centrifugado.

Por último, las columnas giratorias se colocaron en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5ml y se añadieron 20µl de Buffer de elución, se incubó durante 1 min y las columnas se centrifugaron a 15.000 x g durante 1min. Se agregaron 20µl adicionales de tampón de elución y se centrifugó nuevamente durante 30seg a 15 000 x g.

7.4.4.3 PCR en punto final para amplificación de sitios metilados

Una vez que obtenido el ADN convertido, se procedió a realizar una PCR en punto final con los oligonucleótidos antes diseñados para identificar metilación. Se realizaron reacciones como se indican en la Tabla 3 y estas reacciones se incubaron en un termociclador marca Gene Amp PCR Systems 9700 con el programa ilustrado en la Tabla 4.

Tabla 3. Componentes de las reacciones preparadas para PCR en punto final de validación del microarreglo.

Componente	Reacción de 25 µl	Conc final
Hot Start Taq 2X Master mix (No de catálogo M0496S)	12µl	1X
10µM Forward primer	0.5µl	
10µM Reverse primer	0.5µl	
ADN	4µl	<1000 ng
Agua libre de nucleasa	8µl	

Tabla 4. Programa para amplificación de ADN convertido con bisulfito de sodio para la validación de microarreglo de metilación.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	30seg
30 ciclos	95°C	30seg
	56°C	60segs
	68°C	1min
Extensión final	68°C	5min
Mantenimiento	4°C	

Después de la PCR en punto final se realizó una electroforesis en gel de agarosa para corroborar la presencia de los amplicones correspondientes a los oligonucleótidos diseñados para validar el microarreglo: el gel se preparó al 1.7% de agarosa, 50ml de TBE con 0.7µl de SYBR Safe. La preparación de las muestras se realizó con 2µl de buffer de carga mezclado con 5µl de las muestras de ADN. Una vez mezcladas las muestras, se procedió a depositar cada una en su pozo correspondiente en el gel de agarosa. La cámara de electroforesis se ajustó a 50V y el corrimiento fue por 1hr. Después se procedió a realizar el análisis del gel de agarosa en un fotodocumentador ajustando las condiciones de lectura para ADN de doble cadena y filtro de emisión para SYBR Safe.

7.5 Análisis de enriquecimiento de vías

Una vez que se obtuvieron los valores β con el software GenomeStudio, se procedió a realizar un análisis para identificar las regiones metiladas diferencialmente entre las condiciones 2D y 3D con ayuda del mismo software (GenomeStudio) usando la corrección de U de Mann-Whitney. El análisis arrojó los valores de cambio o FoldChange, los valores de falsos positivos o FDR y los valores de P para nuestros resultados de metilación diferencial. De esta manera obtuvimos listas con los patrones de metilación diferencial para cada una de las líneas celulares de estudio en las dos condiciones analizadas, estas listas se filtraron para eliminar de las listas valores repetidos o espacios sin valor.

Dada la gran cantidad de datos se optó por hacer un filtrado de los datos que tuvieran un FoldChange de 4 para seleccionar las regiones diferencialmente metiladas a estudiar en cada una de nuestras líneas celulares de interés.

Con lo anterior, se procedió a evaluar el impacto de la metilación de ADN en procesos y vías celulares asociados mediante la realización de un análisis bioinformático con el

programa R de los datos de la metilación diferencial previamente obtenidos. Se hizo uso de datos para anotación funcional y la visualización de los datos de expresión en el contexto vías biológicas KEGG y GO haciendo uso del lenguaje de programación R studio.

7.6 Selección de un gen modulado epigenéticamente como propuesta para su análisis funcional

Para este objetivo, se realizó un análisis comparativo con nuestras listas de metilación diferencial para identificar los genes potencialmente modulados por metilación del ADN que se compartían entre nuestras muestras de interés, los genes únicos para cada muestra y estimar el número de genes hiper o hipometilados entre cada una de nuestras líneas celulares de estudio.

Así pues, tuvimos especial interés en los genes hipometilados y asociados a procesos de invasión y metástasis que estuvieron compartidos en nuestras tres líneas celulares de estudio. El gen seleccionado fue USP44 para el cual se realizó un análisis bioinformático que permitió la identificación de los sitios CpG en la región promotora del gen, así mismo se revisó la literatura y bases de datos biológicas como TCGA para poder establecer el potencial rol de este gen en la carcinogénesis del cáncer de mama.

8. Resultados

8.1 Establecimiento de cultivos celulares en 2D y 3D

En este proyecto se utilizaron tres líneas celulares con distintas morfologías y características reportadas en la literatura, las cuales se cultivaron utilizando dos de metodologías: 2D y 3D.

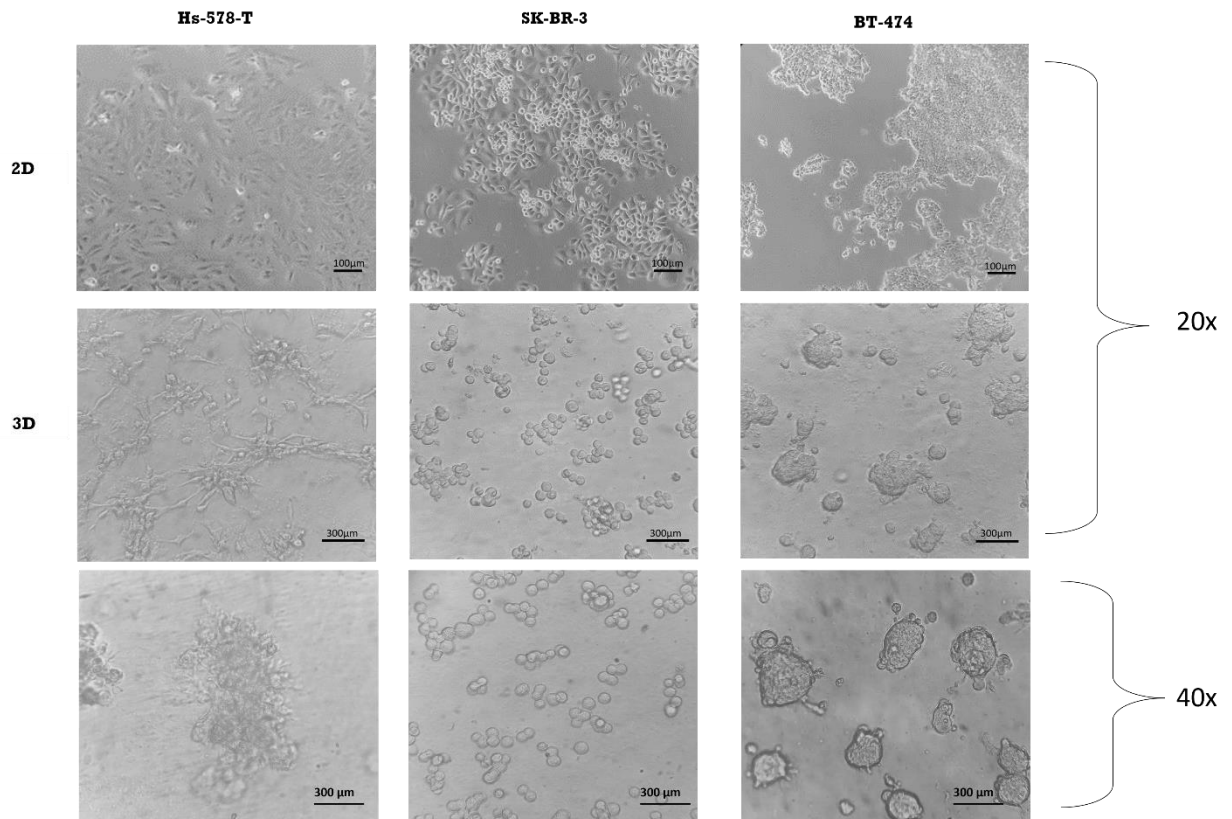


Figura 12. Morfología de las líneas celulares Hs-578T, BT-474 y SK-BR-3 en cultivo 2D y cultivos celulares 3D observados en microscopía óptica (20x y 40x).

Las células Hs-578-T cultivadas en 2D poseen morfología epitelial y presentan una forma alargada o poligonal. Estas células no expresan ER, PR y HER2 por lo que son triple negativo clasificadas en el subtipo basal B con alto grado de prevalencia, agresividad, recaída y resistencia a terapia convencional en pacientes, además, poseen gran capacidad de invasión, migración y metástasis, migran de forma individual-mesenquimatosa. En cultivo en 3D presentan morfología tipo estrellada, se observan interacciones célula-célula y célula-MEC, esto se asocia a una pérdida de polaridad y reorganización de estructuras, curiosamente se observaron prolongaciones que conectan las células.

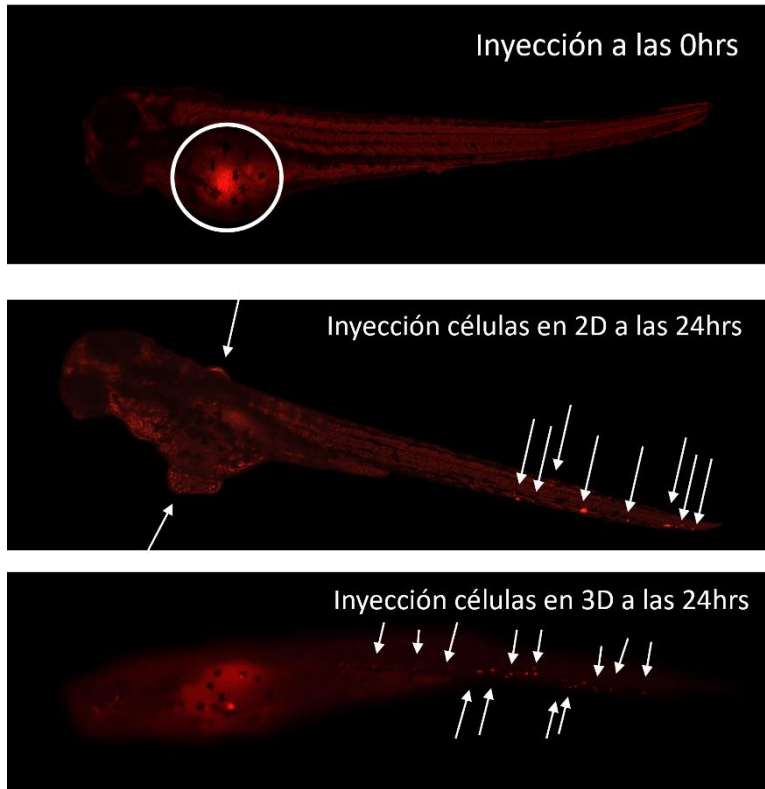
Las células SK-BR-3 cultivadas en 2D presentan una morfología epitelial con forma redondeada. Estas células presentan sobreexpresión de HER2 y son negativas para ER y PR, se ha descrito que tienen una capacidad tumorigénica alta, potencial metastásico moderado a bajo, de mal pronóstico y resistencia a terapia convencional en pacientes. La forma en que migran es individual- mesenquimatosa. En cultivo en 3D esta línea celular presenta una morfología en racimo de uvas en la que se observan interacciones célula-célula, pérdida de la polaridad y reorganización de estructuras. Las células BT-474 en 2D presentan una morfología epitelial y se observa que forman parches o colonias compactas. Estas células se clasifican en el subtipo luminal tipo B, siendo positivas a ER, PR y HER2, se ha descrito que tiene bajo potencial tumorigénico, invasión alta a moderada y buena respuesta a tratamientos convencionales con capacidad metastásica moderada en pacientes. La forma en que estas células migran es colectiva. En cultivo en 3D estas células poseen una morfología de tipo masa redondeada con pérdida de polaridad y reorganización estructural, observando interacción célula-célula y con la MEC.

8.2 Análisis de capacidad de invasión y migración *in vivo* en un modelo de xenotrasplantes

Primero se realizó la microinyección de las células provenientes de cultivo 2D y 3D en los peces cebra y después se procedió a analizar cada uno de los peces por microscopía de fluorescencia (Microscopio óptico ZEISS Axioscope) con el objetivo 10x, se tomaron fotografías de los embriones en campo claro y con exposición a fluorescencia mediante el software AXIO observer Z1, después las imágenes obtenidas se procesaron en el software ImageJ para armar fotografías de los embriones de cuerpo completo como se muestra en las siguientes figuras. El número de células se determinó mediante cuantificación de la fluorescencia mediante thresholding y máscaras con ayuda del programa ImageJ y los datos obtenidos se reportaron en histogramas de frecuencias de la figura 13, 14 y 15 apartado B para cada línea celular, luego se procedió a ver una análisis por ANOVA unidireccional para comparar el número de células que migraron en un condición en 2D y 3D y de esta manera identificar si existía diferencia significativa en la capacidad de invasión de células cultivadas en las dos condiciones de estudio y entre líneas celulares.

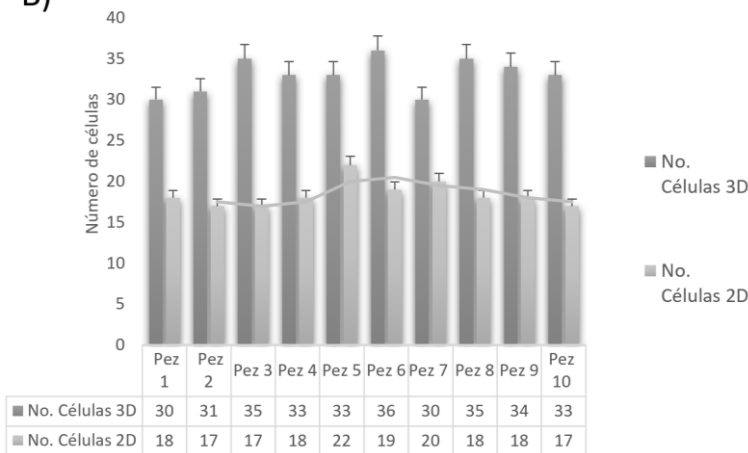
8.2.1 Línea celular Hs-578-T

Figura 13. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular Hs-578-T.

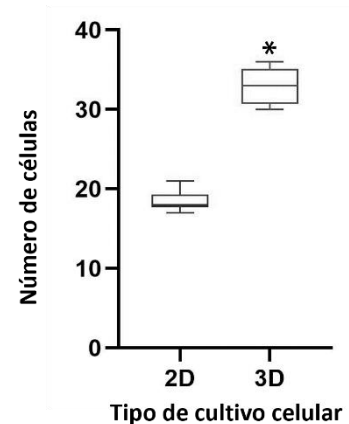


A) Imágenes representativas de embriones de pez cebra un día después de la inyección para células Hs-578-T cultivadas en 2D y 3D; arriba un control sin inyección, abajo pez cebra con inyección: las flechas blancas muestran las células marcadas con el tinte fluorescente que migraron fuera del sitio primario de inyección que se encierra en un círculo.

B) Línea celular Hs-578-T



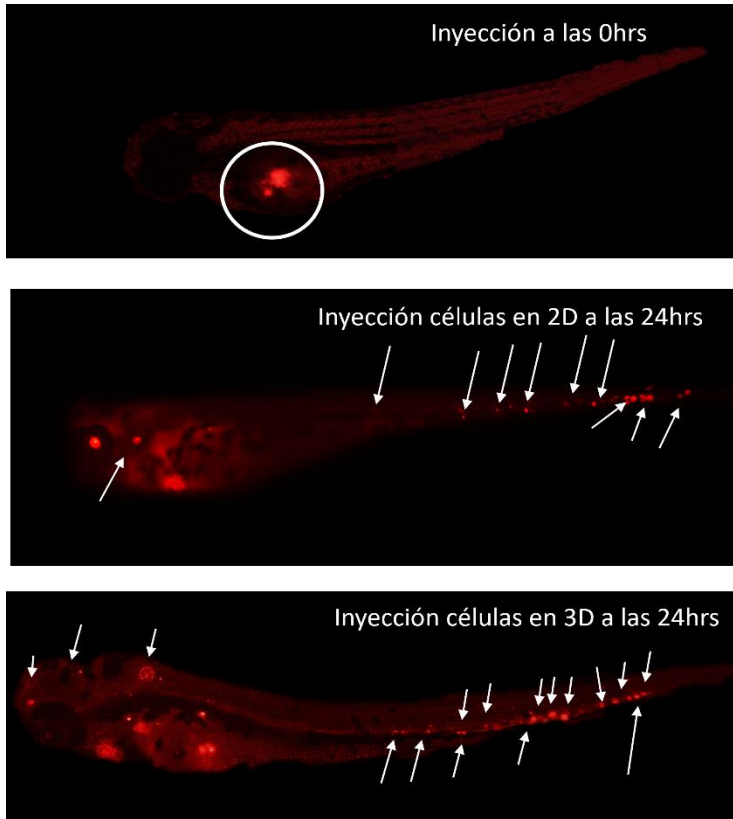
C) Línea celular Hs-578-T



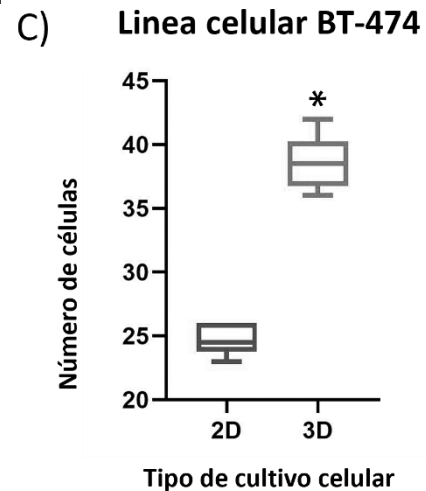
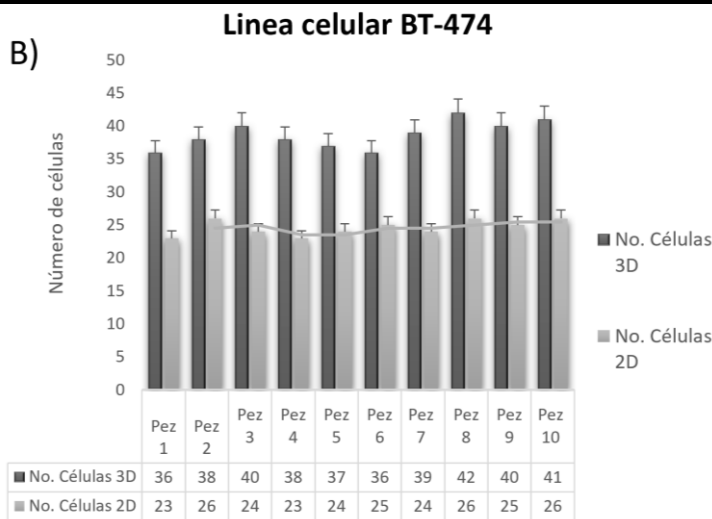
B) Comparación del número de células en cultivo 3D y 2D que migraron fuera del sitio de inyección principal (saco vitelino) en el pez. C) Análisis estadístico por ANOVA unidireccional, entre inyecciones de células 2D y 3D, $*p \leq 0,05$.

7.2.2 Línea celular BT-474

Figura 14. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular BT-474.



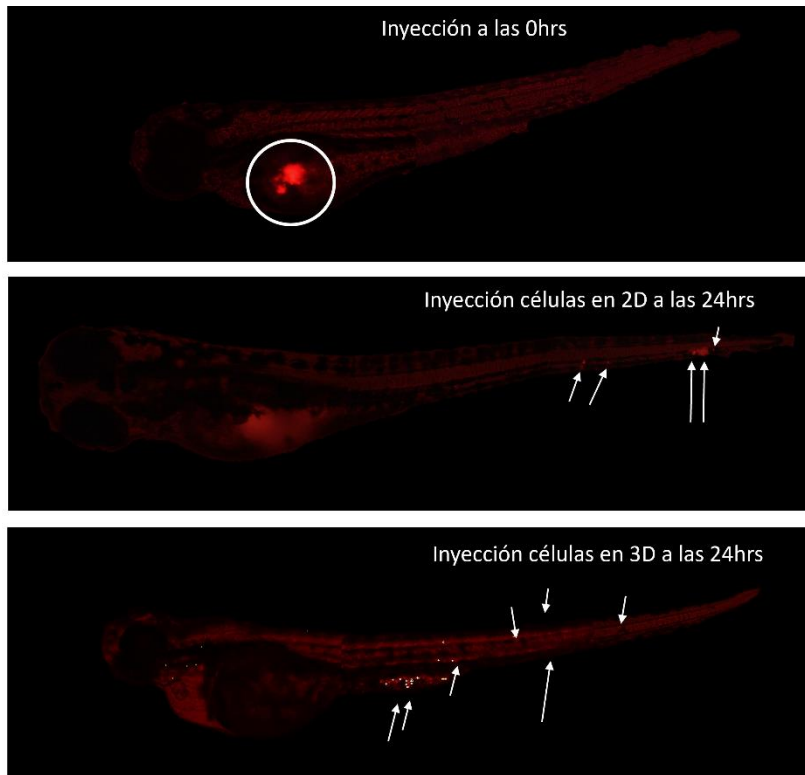
A) Imágenes representativas de embriones de pez cebra un día después de la inyección para células Hs-578-T cultivadas en 2D y 3D; arriba un control sin inyección, abajo pez cebra con inyección: las flechas blancas muestran las células marcadas con el tinte fluorescente que migraron fuera del sitio primario de inyección que se encierra en un círculo.



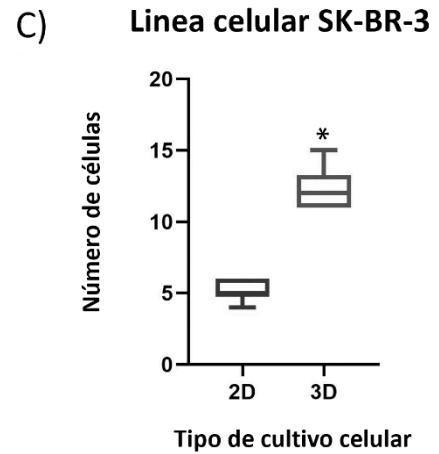
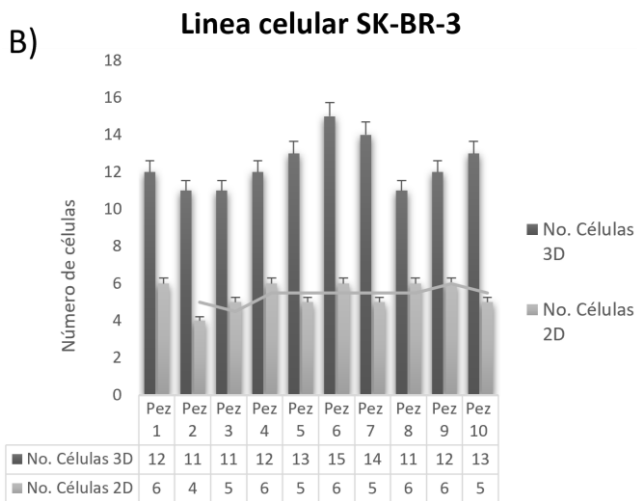
B) Comparación del número de células en cultivo 3D y 2D que migraron fuera del sitio de inyección principal (saco vitelino) en el pez. C) Análisis estadístico por ANOVA unidireccional, entre inyecciones de células 2D y 3D, $*p \leq 0,05$.

7.2.3 Línea celular SK-BR-3

Figura 15. Análisis de migración e invasión in vivo para la línea celular SK-BR-3.



A) Imágenes representativas de embriones de pez cebra un día después de la inyección para células Hs-578-T cultivadas en 2D y 3D; arriba un control sin inyección, abajo pez cebra con inyección: las flechas blancas muestran las células marcadas con el tinte fluorescente que migraron fuera del sitio primario de inyección que se encierra en un círculo.



B) Comparación del número de células en cultivo 3D y 2D que migraron fuera del sitio de inyección principal (saco vitelino) en el pez. C) Análisis estadístico por ANOVA unidireccional, entre inyecciones de células 2D y 3D, * $p \leq 0,05$.

En este trabajo evaluamos la capacidad de invasión y el potencial metastásico de tres líneas celulares de cáncer de mama que caen en diferentes subtipos (triple negativo, luminal y HER2+) con la finalidad de poder encontrar diferencias significativas cuando las células son cultivadas en 2D o 3D. Para cumplir con lo anteriormente mencionado, se realizaron diferentes comparaciones entre el número de células que migraron fuera del sitio principal de inyección en los embriones de pez cebra (saco vitelino) y la distribución de estas a lo largo del cuerpo del embrión para las tres líneas celulares de estudio.

De manera general respecto a las células cultivadas en 2D en la línea celular BT-474 (Figura 14) se observa la mayor capacidad de invasión y metástasis con un promedio de migración de 24.6 células en donde los embriones presentaban también formación de tumores secundarios las células se localizaron a lo largo del cuerpo del pez, por su parte en la línea Hs-578-T se obtuvo un promedio de migración de 18 células, los embriones presentaban una dispersión de células que migraron a lo largo de todo el cuerpo y también se encontraron embriones con formación de tumores secundarios (Figura 14 apartado A), por último la línea SK-BR-3 fue en la que el promedio de células que migraron fue menor (5.3) y solo se localizaron en el tronco y la cola. Estos resultados se correlacionan con lo descrito en la literatura para las líneas celulares de estudio, a excepción de la línea BT-474 que se ha clasificado en el subtipo luminal se ha propuesto a reclasificación por sus características de alta agresividad y capacidad metastásica e invasiva lo cual también se refleja bien en nuestro modelo *in vivo*.

Respecto al análisis de la capacidad y migración de células crecidas en 3D se observó un aumento considerable en el número de células que migraron respecto de las células del cultivo en 2D, para la línea Hs-578-T el promedio de células que migraron fue de 32 (Figura 13, apartado C) observando invasión a lo largo de todo el cuerpo del pez y formación de tumores secundarios en los embriones, por su parte la línea BT-474 migraron con un promedio de 38 células (Figura 14, apartado C) observándose también invasión a lo largo de todo el cuerpo de los embriones y formación de tumores secundarios. Por último, para la línea SK-BR-3 el promedio de células que migraron fue de 12 (Figura 15, apartado C) en los embriones no se observó formación de

tumores secundarios y la distribución de las células solo fue en la cola o tronco del embrión.

Con los resultados anteriores se realizaron análisis estadísticos por ANOVA unidireccional para realizar una comparación múltiple del número promedio de células que migraron en cultivo 2D y 3D. De manera general nuestros resultados indicaron que entre las líneas celulares existe una diferencia significativa entre el número de células que migraron en nuestras dos condiciones de cultivo presentando mayor capacidad de migración cuando las células se cultivan en 3D, esto nos habla de la importancia que tienen los cultivos celulares en 3D al tener la capacidad de reflejar mejor la heterogeneidad en los hallmarks del cáncer a lo largo de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, en este caso la invasión y metástasis que en nuestro modelo *in vivo* está muy bien representada.

7.3 Análisis del estado de metilación de 866 895 sitios CpG individuales a través del genoma de las células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D.

7.3.1 Cuantificación, análisis de la integridad y pureza de ADN genómico extraído de células cultivadas en 2D y 3D

Para realizar el análisis del estado de metilación de nuestras muestras por microarreglos, fue necesario extraer 2000ng ADN genómico de las líneas celulares cultivadas tanto en condiciones 2D y 3D.

Tabla 5. Cuantificación por nanodrop del ADN genómico de las células SK-BR-3, Hs-578-T y BT-474 cultivadas en 2D.

	SK-BR-3	Hs-578T	BT-474
Concentración	1088 ng/ μ l	326 ng/ μ l	489 ng/ μ l
Pureza	260/280= 1.8 260/230=2.05	260/280= 1.8 260/230=2.06	260/280= 1.8 260/230=1.8

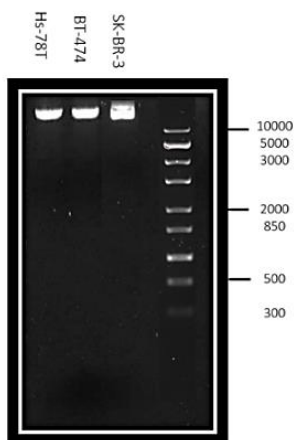


Figura 1. Gel de agarosa al 0.7% para el análisis de la integridad del ADN genómico de células cultivadas en 2D

Tabla 6. Cuantificación por nanodrop del ADN genómico de las células SK-BR-3, Hs-578-T y BT-474 cultivadas en 3D.

	SK-BR-3	Hs-578T	BT-474
Concentración	9.8 ng/μl	16.2 ng/μl	8.7 ng/μl
Pureza	260/280=1.8 260/230=2	260/280=1.8 260/230=1.9	260/280=1.7 260/230=1.6

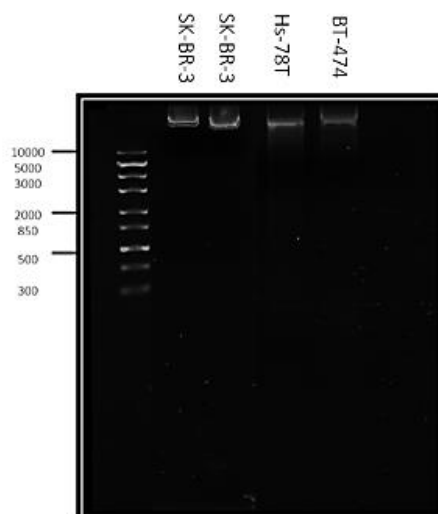
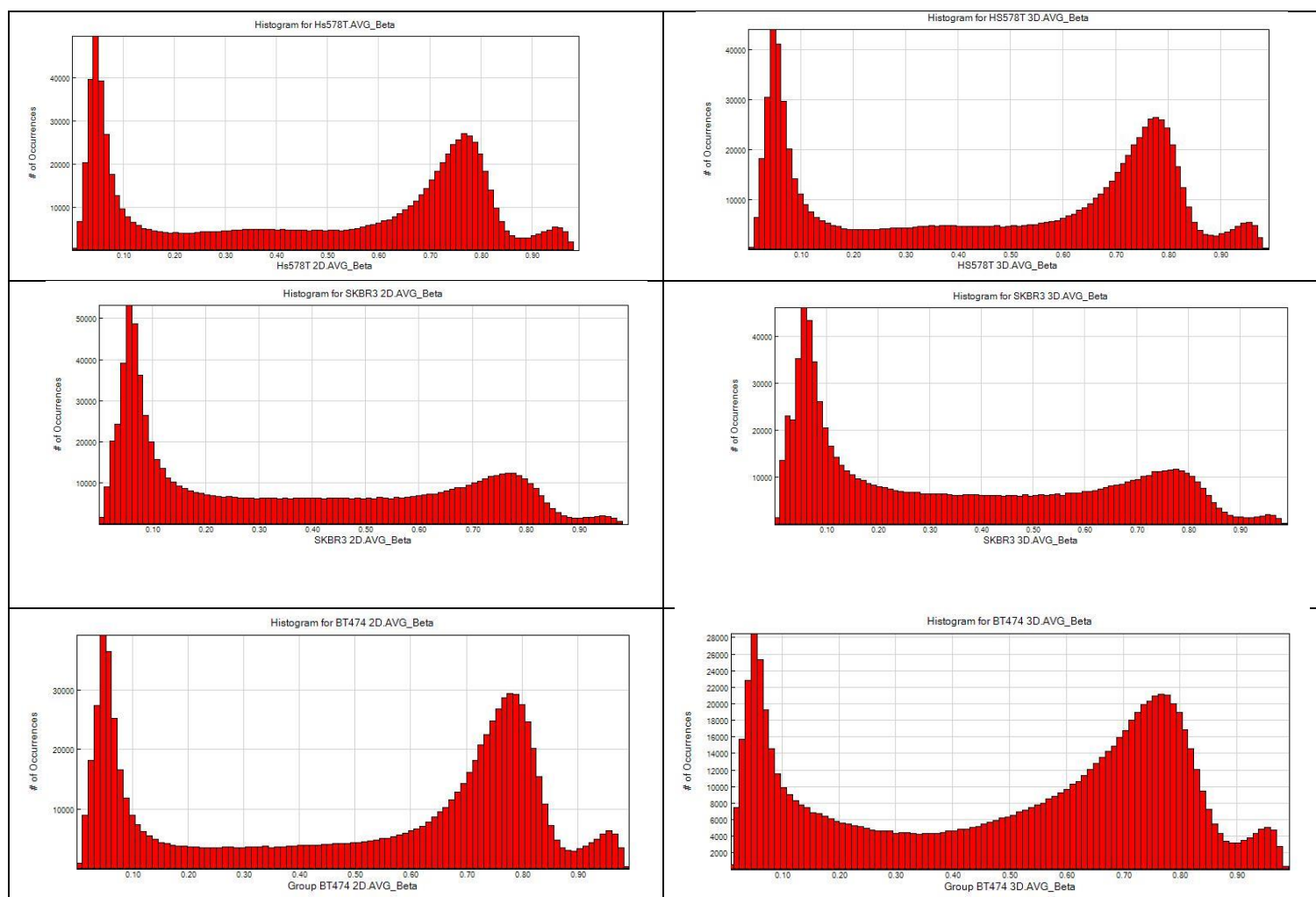


Figura 2. Gel de agarosa al 0.7% para el análisis de la integridad del ADN genómico de células cultivadas en 3D.

7.3.2 Gráficos de densidad del estado de metilación de regiones analizadas con el microarreglo Infinium MethylationEPIC BeadChip de la compañía Illumina.

Los gráficos de densidad de los datos fueron obtenidos a partir de ensayo de metilación del ADN con los archivos IDAT usando el programa GenomeStudio, este análisis fue de mucha utilidad para poder observar un panorama completo de la metilación del ADN entre nuestras muestras y condiciones experimentales, en los gráficos se observa a los valores de metilación (conocidos como valores β) en el eje de las X, y en el eje de las Y los conteos de regiones del genoma analizadas, dichos valores siguen un patrón bimodal esto se debe a que los valores β oscilan entre 0 (si un sitio está completamente desmetilado) y 1 (si un sitio está completamente metilado).

Tabla 7. Gráficos de densidad para todas las líneas celulares de estudio.



7.3.3 Análisis diferencial del nivel de metilación del ADN genómico entre los grupos experimentales.

Para el análisis de metilación diferencial los datos, se tomaron en cuenta los valores β para cada uno de los sitios interrogados y en el programa GenomeStudio se seleccionó la opción de análisis de metilación diferencial usando la corrección de U de Mann-Whitney para identificar las regiones metiladas diferencialmente entre las condiciones 2D y 3D. El análisis arrojó los valores de cambio o FoldChange, los valores de falsos positivos o FDR y los valores de P para nuestros resultados de metilación diferencial. De esta manera obtuvimos listas con los patrones de metilación diferencial (hiper o hipometilados) para cada una de las líneas celulares de estudio en las dos condiciones analizadas, estas listas se filtraron y de esta manera se pudo identificar que, entre las líneas celulares, 1052 sitios no se metilaron de manera diferencial, entonces, para un sitio metilado diferencialmente (DMS) se consideró $|\Delta\beta| > 0.1$ y un valor de $P < 0.05$, así entonces, $\Delta\beta > 0.1$ se consideró un sitio hipermetilado y $\Delta\beta < -0.1$ se consideró un sitio hipometilado. Para la línea celular Hs-578-T se metilaron diferencialmente 1391 genes de los cuales 824 se hipermetilaron y 567 se hipometilaron (Figura 16), para la línea celular SK-BR-3 se metilaron diferencialmente 1512 (Figura 17) genes de los cuales 879 se hipermetilaron y 633 se hipometilaron y por último para la línea celular BT-474, se metilaron diferencialmente 2078 (Figura 18) genes de los cuales 1379 se hipermetilaron y 699 se hipometilaron.

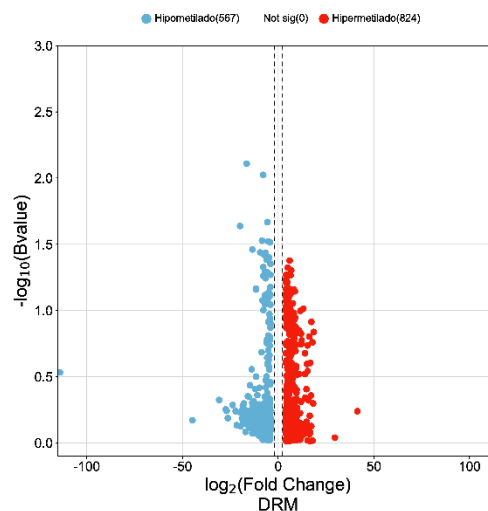


Figura 16. Volcano plot que ilustra los 1391 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular Hs-578-T: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.

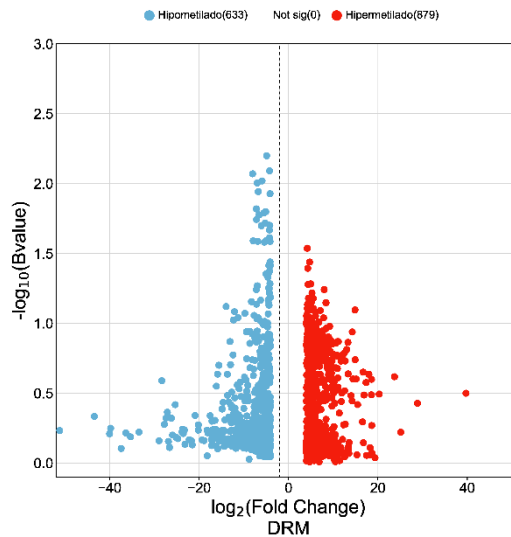


Figura 17. Volcano plot que ilustra los 1512 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular SK-BR-3: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.

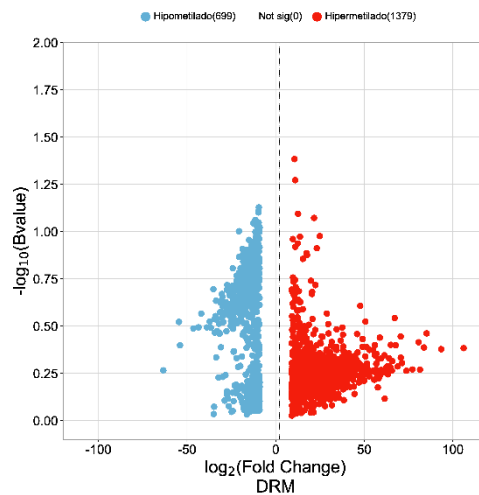


Figura 18. Volcano plot que ilustra los 2078 genes metilados diferencialmente ($P < 0.01$) respecto a sus valores β para la línea celular BT-474: en azul están los genes hipometilados y en rojo los genes hipermetilados.

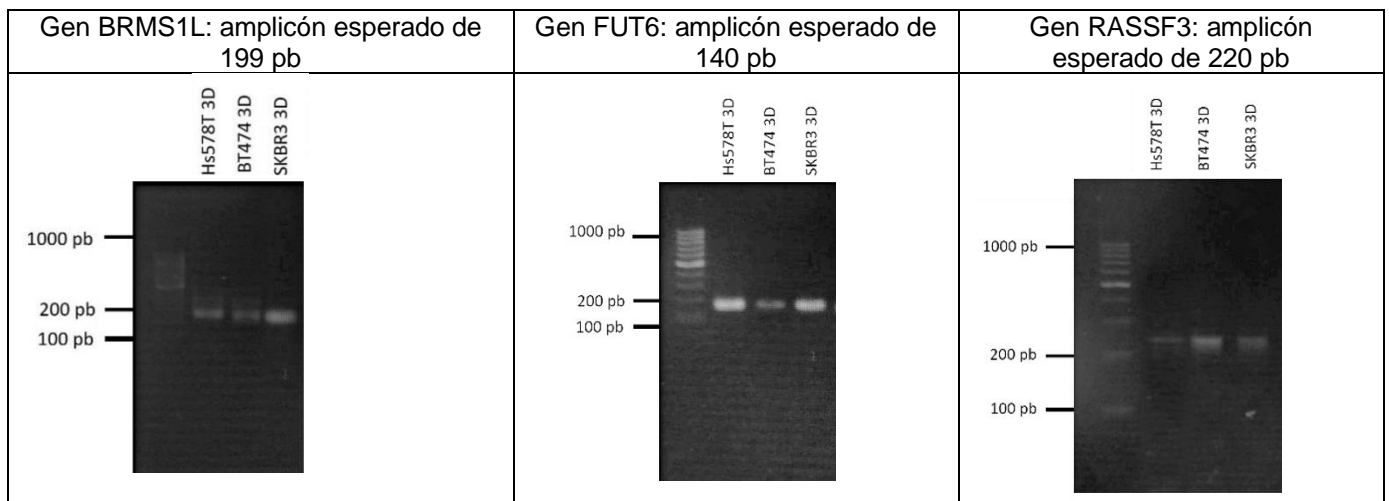
7.3.4 Validación del microarreglo de metilación

Para validar los resultados del microarreglo se procedió a realizar una PCR con ADN tratado con bisulfito de sodio, el cual sirve para convertir a las citosinas no metiladas en uracilos, que después de una amplificación de todo el genoma se convertirán en timinas en la secuencia. Los primers se diseñaron con ayuda del programa MethPrimer para hibridar en la secuencia promotora de los genes de interés justo en los sitios

donde estaban presentes islas CpG, así pues, después de la conversión con bisulfito la secuencia del ADN genómico procedente de las diferentes células estudiadas cambiaría las citosinas no metiladas por timinas y de esta manera pudimos identificar si un sitio estaba o no metilado.

En la tabla se muestra el resultado de la PCR para los genes BRMS1L y RASS-F3 se diseñaron oligos para identificar hipermetilación y para el gen FUT6 se diseñaron oligos para identificar hipometilación con ADN tratado con bisulfito de sodio.

Tabla 8. Geles de agarosa al 1.7% para verificar el tamaño del amplicón después de la PCR con bisulfito de sodio.



Se puede observar que después del tratamiento con bisulfito de sodio pudimos discernir entre lo no metilado y lo metilado con los primers diseñados con ayuda del programa en línea MethPrimer, así entonces, para cada uno de los genes interrogados obtuvimos las ampliaciones en el peso esperado, indicándonos que con esta metodología podemos afirmar que el promotor de los genes BRMS1L y RASS-F3 está metilado y por tanto su expresión disminuida en cultivos en 3D, por su parte para el gen FUT6 su promotor esta hipometilado en cultivos 3D y por lo tanto su expresión aumentada.

7.4 El método de cultivo en 3D induce cambios en el perfil de metilación de las células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3.

Con la finalidad de obtener los perfiles de metilación diferencial asociados a la

expresión de genes modulados de manera epigenética se determinó el nivel de metilación con valores B de los promotores en las células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3, utilizando microarreglos de metilación Infinium MethylationEPIC BeadChip de la compañía Illumina. Se analizaron los datos de metilación de una réplica biológica, sólo los sitios asociados a promotores de genes con cambio significativo ($FC_{+/-4}$; $p \leq 0.05$) se incluyeron en el análisis. En el perfil de metilación diferencial para la línea celular Hs-578-T se identificaron 1391 sitios metilados diferencialmente, para las células BT-474 se identificaron 2078 sitios metilados diferencial y finalmente para la línea celular SK-BR-3 se identificaron 1512 sitios metilados diferencialmente.

Con estos datos, se procedió a realizar un diagrama de agrupamiento con el programa R que nos permitió visualizar el número de genes diferencialmente metilados que se compartían entre líneas celulares, los genes que eran exclusivos y en el contexto de la metilación que genes podrían estar encendidos o apagados.

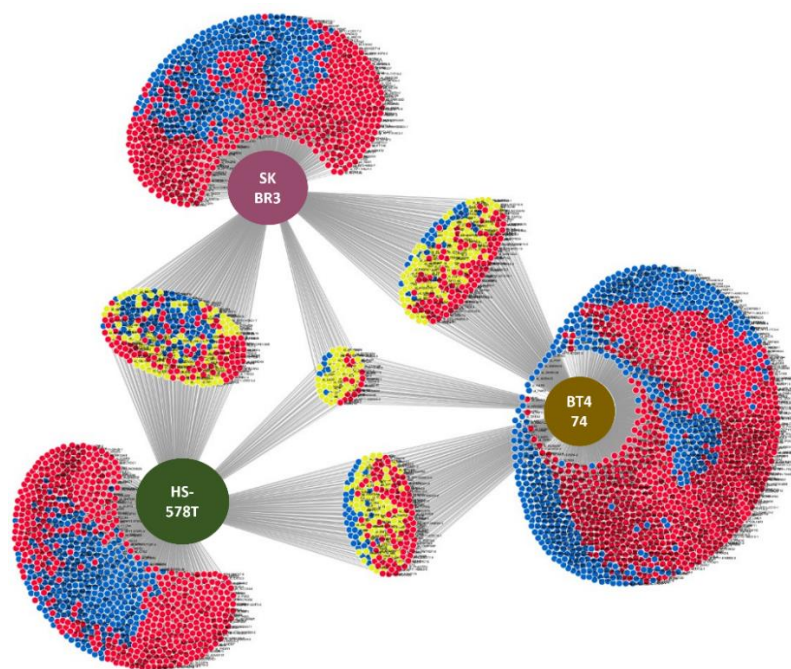


Figura 19. Agrupamiento de los genes diferencialmente metilados: en azul están los genes hipometilados, en rojo genes hipermetilados y en amarillo genes con metilación diferente según la línea celular.

En la figura 21 se muestra el agrupamiento de los genes diferencialmente metilados a nivel promotor con un $FC_{+/-4}$; $p \leq 0.05$, en rojo se aprecian los genes hipermetilados,

en azul las regiones hipometiladas y en amarillo son regiones que pueden estar hipo o hiper metiladas. De manera general pudimos observar que la línea celular BT-474 presentó más regiones hipermetiladas en comparación con las otras dos líneas celulares y que esta misma línea presenta el mayor número de regiones metiladas diferencialmente. Asimismo, pudimos observar que la línea celular Hs-578-T y SK-BR-3 comparten más regiones metiladas diferencialmente respecto a la línea celular BT-474, por último, nuestros resultados indican que la línea celular Hs-578-T y SK-BR-3 poseen un número de regiones hipometiladas similar.

Después, se realizó un diagrama de Venn que ilustra el número de genes potencialmente afectados por metilación del ADN en su región promotora, en color azul están los genes hipometilados, en rojo los hipermetilados y en color amarillo están genes que pueden variar en su nivel de metilación (hipo o hipermetilado) según la línea celular. Particularmente nuestro interés se centró en aquellos genes hipometilados y que estuvieran compartidos entre las tres líneas celulares pues entonces podríamos deducir que dichos genes están sobre expresados en las células de estudio y de estos seleccionamos un gen como propuesta de objetivo terapéutico contra la invasión y metástasis.

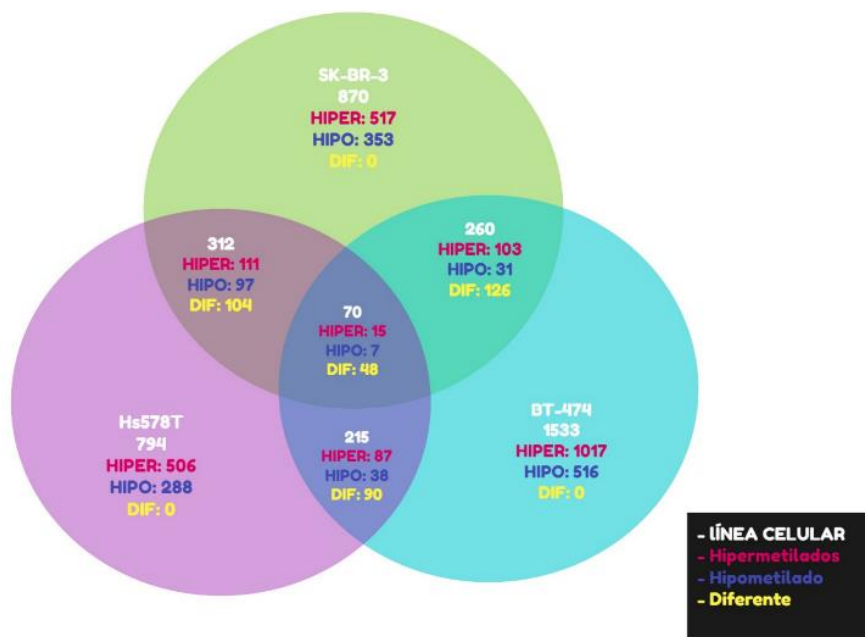


Figura 20. Diagrama de Venn que resume la agrupación para cada línea celular del número de sitios hipometilado, hipermetilado y con perfil de metilación diferente.

7.5 Descripción general de los genes módulos de manera epigenética por metilación del ADN entre las líneas células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3.

Para evaluar el impacto del cultivo en 3D en procesos y vías celulares, hicimos un análisis bioinformático de los datos de los microarreglos de ADN de enriquecimiento funcional con los valores del análisis de metilación diferencial para los genes identificados.

El análisis con GO incluyó procesos biológicos, componentes celulares y categorías de funciones moleculares, por su parte el análisis de enriquecimiento con KEGG, nos arrojó vías de señalización que se enriquecieron significativamente con los genes que se reportan con cambios en el nivel de metilación. De manera general en todas las líneas celulares se enriquecieron vías de señalización asociadas a migración, motilidad, invasión celular, reparación del ADN, ciclo celular y metabolismo, entre las vías de interés estaban aquellas relacionadas a RAP1, Rho GTPasas, Ras, citoesqueleto (actina), entre otras. La línea SK-BR-3 es la que presentó más genes hipometilados en relación con invasión y metástasis, en la línea BT-474 y Hs-578-T se identificaron más genes hipometilados que estaban relacionados a invasión y migración celular.

Línea celular Hs-578-T

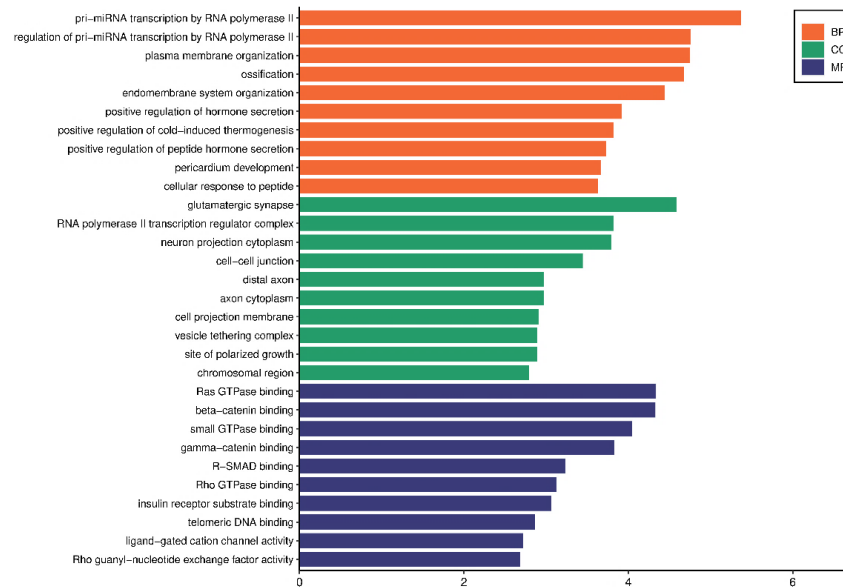


Figura 21. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células Hs-578-T. El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor de enriquecimiento en el eje X.

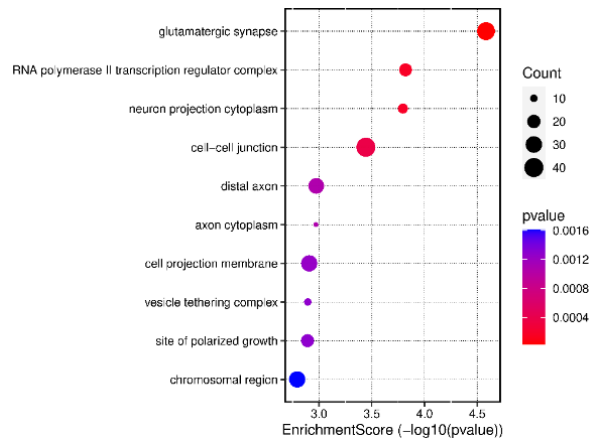


Figura 22. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO de la línea celular Hs-578-T. El tamaño de la burbuja indica el número relativo de genes en el conjunto. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.

Haciendo referencia a la reprogramación epigenética que experimentan las células en cultivos 3D, para la línea celular Hs-578-T, identificamos una serie de promotores de genes hipermetilados que participan en vías celulares implicadas en el desarrollo del cáncer, tales como la señalización SMAD 3 y 2, APC, actina, caveolinas, PI3K, CDH9, NOTCH1, CREB5, STAT1, RAB2A, ICAM1, AKT1, la señalización de la vía Hippo, la vía de señalización Jak-STAT (STAT1) y la vía de inflamación mediada por quimiocinas y citocinas como SPP1, el miR-141, entre otros (Figura 23). Además, la hipometilación de los promotores de genes supresores de tumor como MAGI1, SMAD4, JAK2, entre otros.

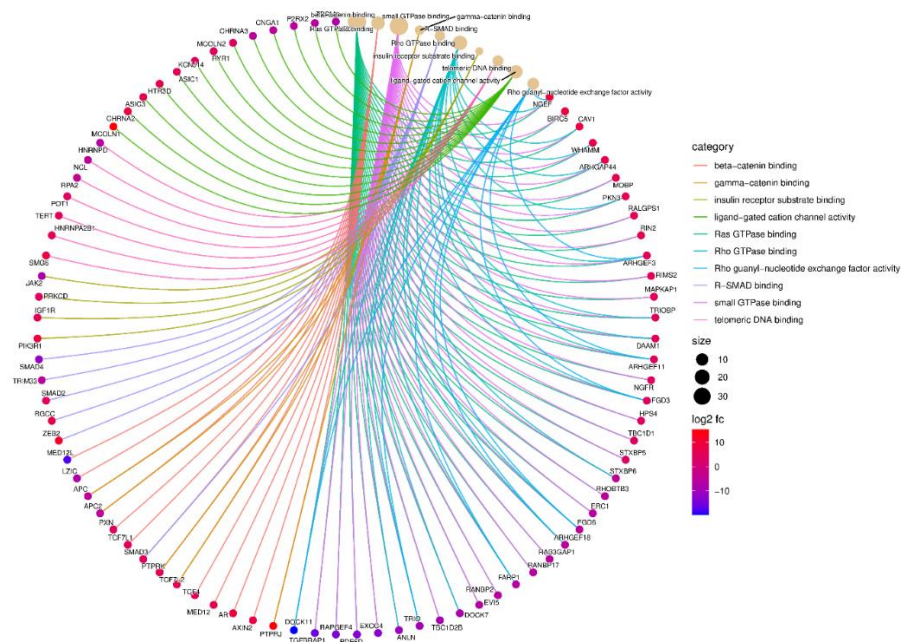


Figura 23. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes

diferencialmente metilados para células Hs-578-T. Cada círculo representa un gen y el tamaño indica el número relacionado de genes. El color de cada cuerda representa una de las 10 mejores rutas enriquecidas. El color de la burbuja indica el valor de cambio o FC donde los rojos están más metilados y los azules están menos metilados.

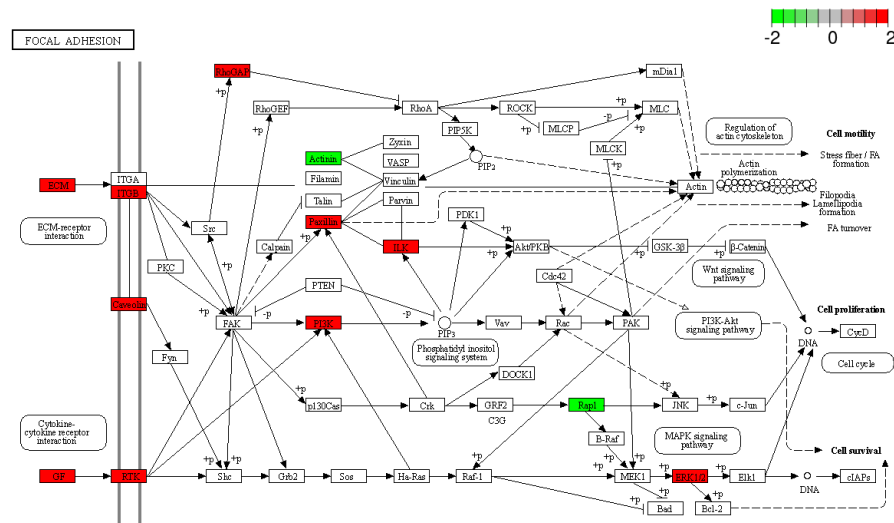


Figura 24. Rutas específicas para células Hs-578-T. Los genes de color se ven afectados por la metilación del ADN. Los genes de color rojo están hipermetilados y los genes de color verde están hipometilados, este diagrama se obtuvo con el software de uso libre Enrichr.

Línea celular BT-474

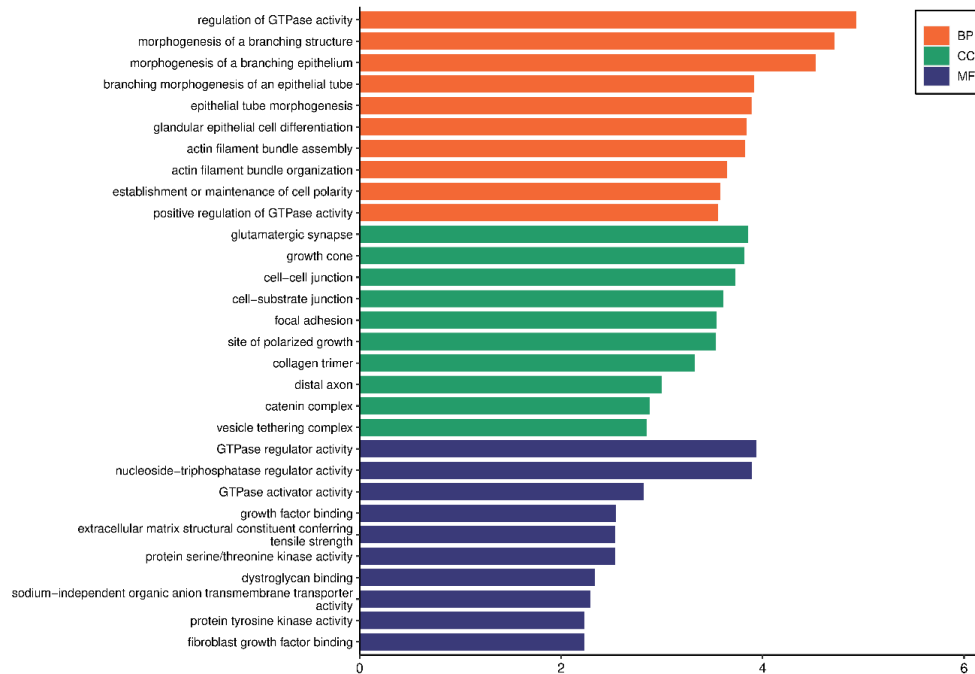


Figura 25. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células BT-474. El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor de enriquecimiento en el eje de las X.

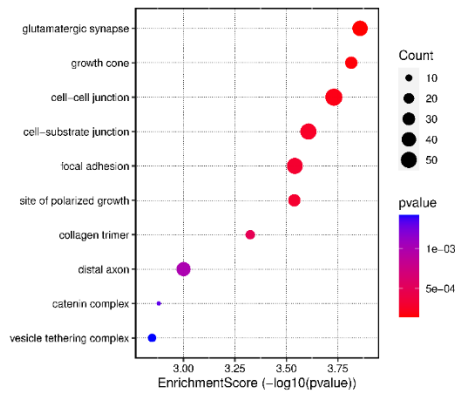


Figura 26. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO para la línea celular BT-474. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.

Haciendo referencia a la reprogramación epigenética que experimentan las células en cultivos 3D, para la línea celular BT-474, identificamos una serie de promotores de genes hipermetilados que participan en vías celulares implicadas en el desarrollo del cáncer, tales como la señalización RHOBTB3, TPM1, SERPINFN2, AGR2, KRAS, la señalización de NOTCH1, FOXA1 entre otros (Figura 27). Además, la hipometilación de los promotores de genes supresores de tumor como RARA, moléculas que participan en el mantenimiento de la estructura celular como la caveolina 3 (CAV3), TP63, PAX2, NRP1, ICAM1 entre otros.

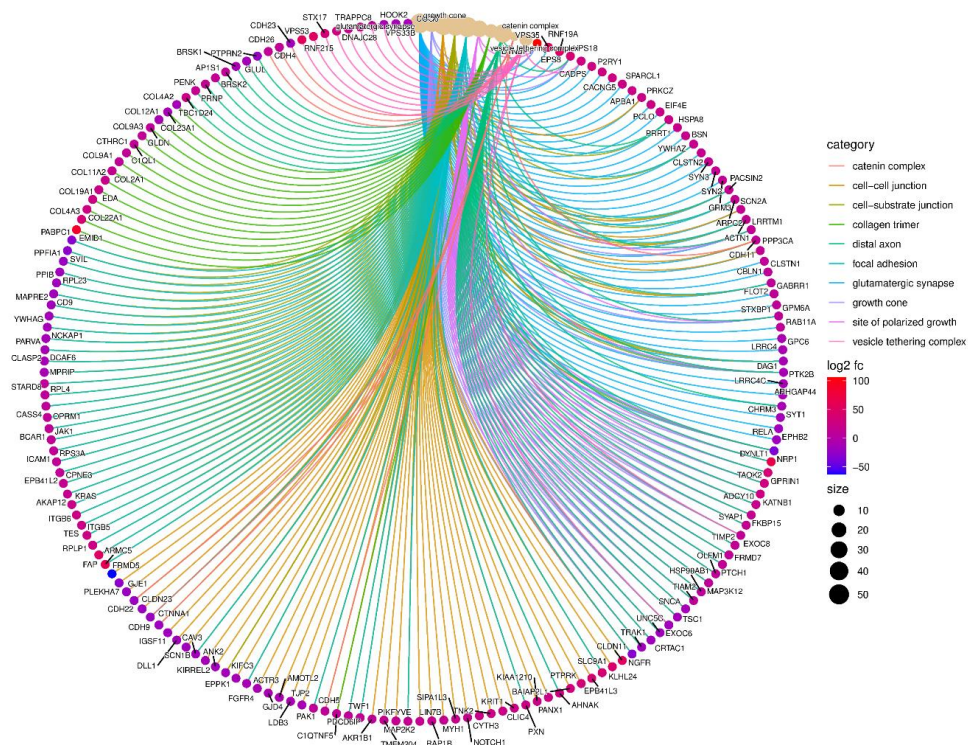


Figura 27. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes

diferencialmente metilados para células BT-474. Cada círculo representa un gen y el tamaño indica el número relacionado de genes. El color de cada cuerda representa una de las 10 mejores rutas enriquecidas. El color de la burbuja indica el valor de cambio o FC donde los rojos están más metilados y los azules están menos metilados.

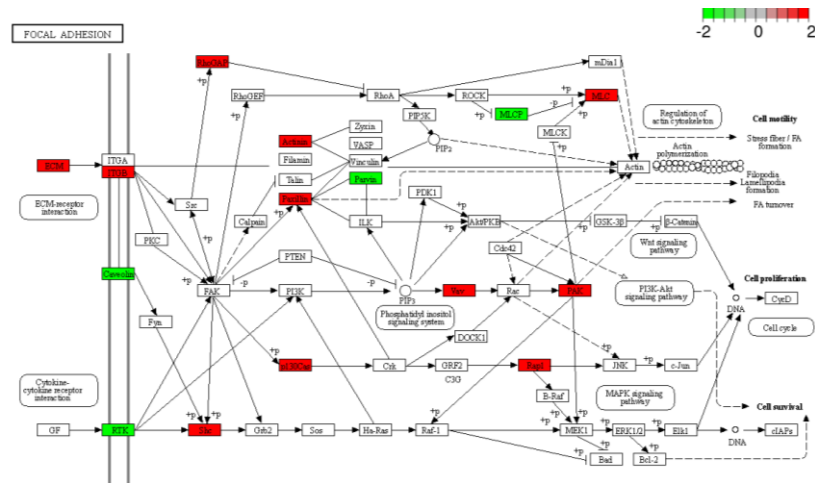


Figura 28. Rutas específicas para células BT-474. Los genes de color se ven afectados por la metilación del ADN, donde los genes de color rojo están hipermetilados y los genes de color verde están hipometilados, este diagrama se obtuvo con el software de uso libre Enrichr.

Línea celular SK-BR-3

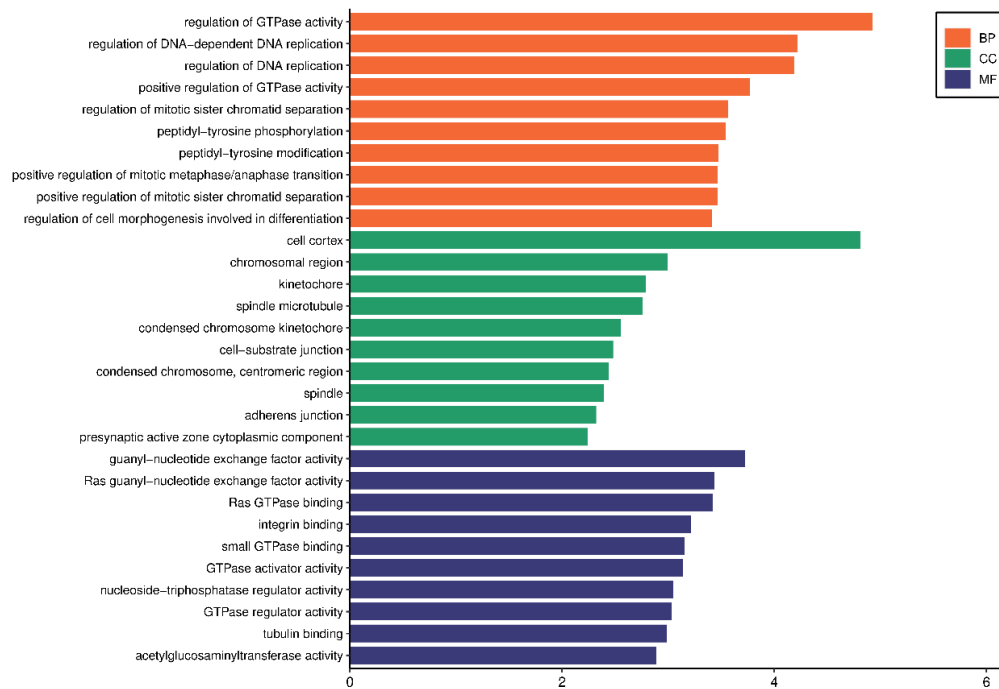


Figura 29. Análisis de funciones biológicas relacionadas con genes asociados a sitios CpG mediante rutas de Ontologías Genéticas (GO) para células SK-BR-3. El eje de la Y la función molecular (MF), el proceso biológico (BP) y el componente celular (CC) y el valor de enriquecimiento en el eje de las X.

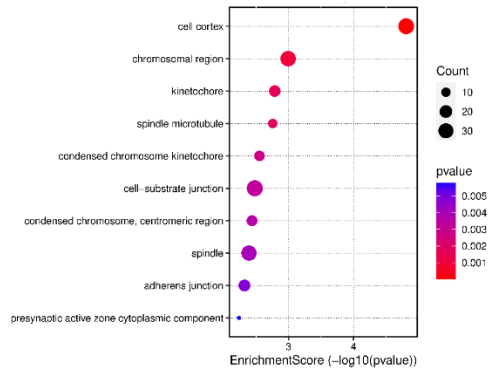


Figura 30. Gráfico de burbuja con el top 10 de compartimentos enriquecidos en GO para la línea celular SK-BR-3. El tamaño de la burbuja indica el número relativo de genes en el conjunto. El color de la burbuja indica el valor p ajustado.

Haciendo referencia a la reprogramación epigenética que experimentan las células en cultivos 3D, para la línea celular SK-BR-3, identificamos una serie de promotores de genes hipermetilados que participan en vías celulares implicadas en el desarrollo del cáncer, tales como la señalización DOCK 1, SMAP2, RGL3, CHN1 involucrados en la señalización de EGFR, CD4, ADAM17, SOCS5, entre otros (Figura 31). Además, la hipometilación de los promotores de genes supresores de tumor como BUB 1, los que participan en la regulación del ciclo celular como, USP44, algunos genes relacionados a la regulación del citoesqueleto de actina como MLCP y FAK entre otros.

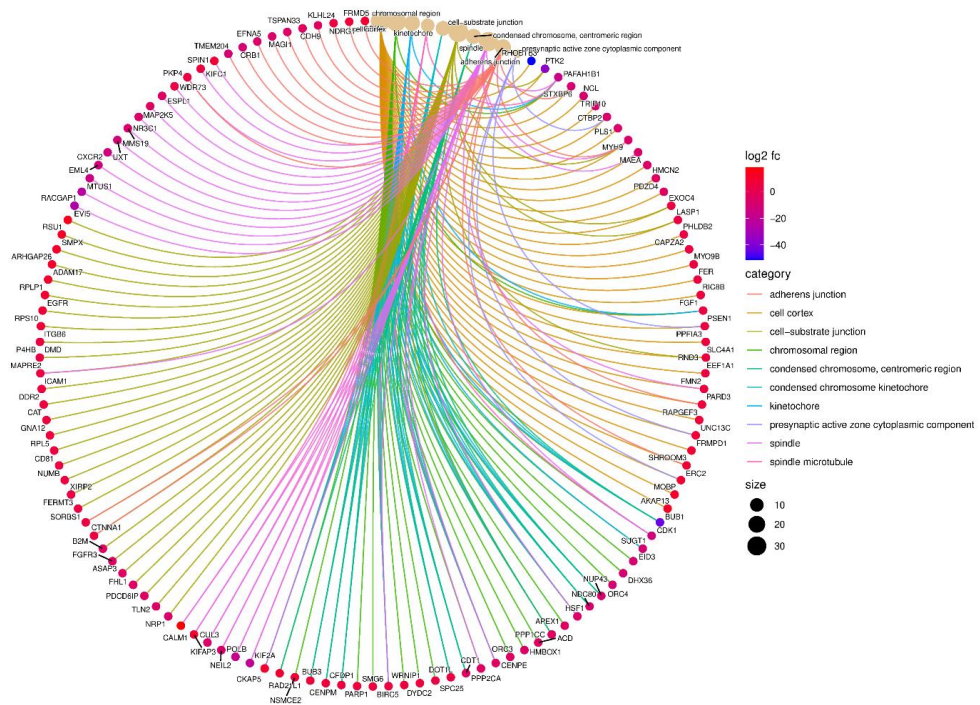


Figura 31. Gráfico de cuerdas del análisis de enriquecimiento de vías KEGG de genes

	cáncer.
WHSC1	Proteína que actúa como un regulador epigenético en múltiples tejidos del organismo, participando en el control de diferentes procesos como la transcripción génica o la reparación del ADN.
RN5S338	No anotado
LCE4A	Diferenciación de queratinocitos y células epidermales
ICAM1	Regulación del diámetro de túbulos, regulación de la polimerización de filamentos de actina, regulador negativo de apoptosis
SPP1	Regulación de regeneración de axones, participa en la proliferación, invasión y metástasis de células tumorales
RP11-5D2-32	RNA largo no codificante no anotado.
AGR2	Proteína involucrada en la respuesta a procesos topológicos y de plegamiento de proteínas, participa en metástasis.
RP11-436A-204	RNA largo no codificante no anotado.
FDXR	Participa en el metabolismo celular de hormonas.
DCTD	Involucrada en procesos de biosíntesis de nucleótidos.
GLT25D2	Proteína involucrada en la autofagia

Tabla 10. Genes hipometilados que se comparte entre las líneas celulares de estudio

Genes Hipometilados	Procesos asociados
KDM5B	Proteína que juega un papel en la represión transcripcional por modificación de histonas, está involucrada en proceso de reparación del ADN y en procesos de invasión y metástasis en cáncer.
ZDHHC20-AS1 RP11-316I3-1	Proteína involucrada en la peptidil-L-cisteína S-palmitoilación RNA largo no codificante no anotado.
SDAD1	Participa en la exportación de subunidades preribosómicas 60S al citoplasma. Se ha involucrado con procesos metastásicos, de proliferación y resistencia a apoptosis en cáncer.
USP44	Proteína que contribuye a la regulación del punto de control del ensamblaje del huso al prevenir el inicio temprano de la anafase. Participa en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER), también desempeña un papel positivo en la respuesta inmunitaria innata a los virus de ADN y se ha reportado tiene un rol dual como supresor tumoral y oncogén en cáncer.
TBC1D2B	Estabiliza uniones celulares que se encuentran en las células epiteliales, participa como supresor tumoral y como oncogén.
CDH9	Involucrada en la adhesión celular, organización de uniones celulares, motilidad celular, mantenimiento de la polaridad celular.

De manera interesante encontramos a USP44 que es una proteasa que funciona como enzima desubiquitinasa y se ha reportado que ayuda a regular el punto de control del

ensamblaje del huso al prevenir el inicio temprano de la anafase, además, esta proteína se ha asociado a procesos de invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer incluidos el de mama sin embargo, existen aún varios puntos a elucidar acerca de la contribución de esta proteína en la migración e invasión en cáncer de mama pues en la literatura existen reportes que aseguran que su sobreexpresión contribuye a estos procesos y otros más en donde su silenciamiento los promueve.

Por lo anterior nos dimos a la tarea de realizar un análisis bioinformático para identificar si en la secuencia promotora del gen había islas CpG y de esta manera asociar los datos obtenidos de nuestro microarreglo de metilación. En la Figura 33, se observan los resultados del análisis por MethPrimer en donde se indican en azul las zonas donde se localizan las islas del promotor de este gen.

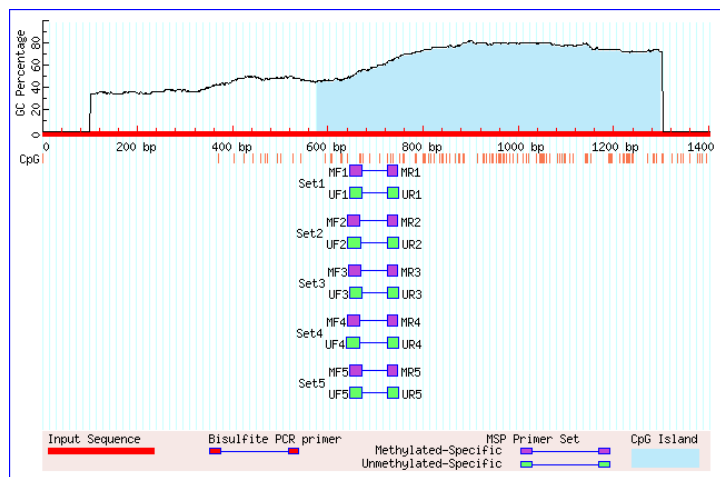


Figura 33. Identificación de Islas CpG en el promotor de USP44.

Después, en bases de datos de pacientes como TCGA analizamos la expresión de USP44 en un contexto de cáncer. En la Figura 34 podemos apreciar que la expresión de dicha proteína se ve aumentada en las diferentes líneas de cáncer de mama triple negativo, esto correlaciona con los datos que obtuvimos en el análisis de metilación sin embargo quedan algunas preguntas por resolver respecto a esta proteína por lo cual una perspectiva de este proyecto es hacer una análisis funcional de este gen y analizar su silenciamiento y si este aumenta o disminuye la migración *in vivo* de las células de estudio y de esta forma poder ir elucidando las rutas de señalización río arriba y abajo que se modulan por su acción.

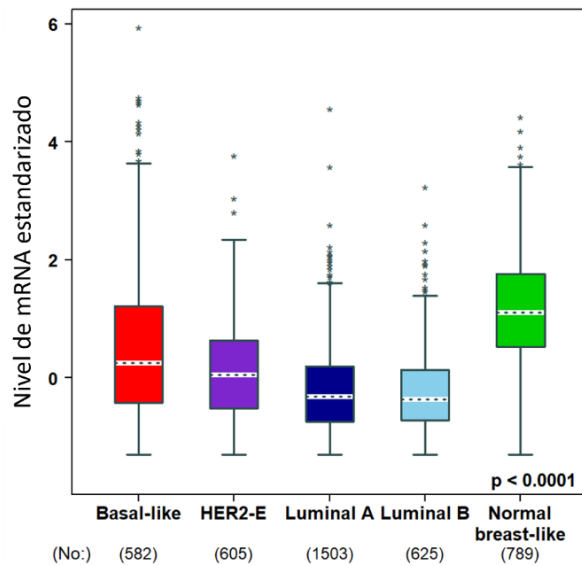


Figura 34. Nivel de expresión de USP44 para los subtipos de cáncer de mama usando muestras de pacientes con cáncer de mama de la base de datos de TCGA: comparación de la expresión de ARNm de USP44 entre muestras normales y de cáncer de mama.

9. Discusión

Hasta hace unos años los mecanismos epigenéticos no se consideraban de gran relevancia en el inicio y progresión tumoral, sin embargo, estudios han podido confirmar que dichos mecanismos son un hallmark del cáncer con gran oportunidad a nivel terapéutico por sus características reversibles. La metilación del ADN que interviene en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, en la impronta e inactivación del cromosoma X, es un mecanismo alterado en cáncer que puede conducir a la sobreexpresión de oncogenes y al silenciamiento de supresores tumorales.

De manera clásica, el estudio del cáncer se ha realizado en modelos de cultivo de células en monocapas que, si bien es útil para descifrar algunos aspectos de la biología del cáncer, no recrea fielmente todos los aspectos de esta enfermedad, pues es de gran importancia recalcar que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer y más aún en los mecanismos epigenéticos que se alteran durante su progresión.

Por lo anterior, surge una necesidad urgente por hacer uso de modelos *in vitro* e *in vivo* que permitan recrear condiciones similares a los de los tumores *in vivo* para el

estudio de células tumorales, en este trabajo hicimos uso de ambos tipos de modelos. Con el modelo de xenotransplantes de cáncer (pez cebra) se logró identificar los fenotipos *in vivo* de las diferentes líneas celulares de estudio y clasificarlas según su capacidad invasiva y metastásica nuestro modelo de estudio aborda muchos aspectos de la cascada metastásica como la intravasación de células tumorales en los vasos sanguíneos y la extravasación en órganos distantes haciéndolo muy práctico para el uso de este tipo de estudios, por otra parte, con el modelo *in vitro* de cultivos celulares 3D organotípicos con Matrigel se logró establecer cultivos celulares con una MEC artificial para de esta manera identificar los cambios morfológicos entre las líneas celulares, recreación de interacción célula-célula y célula MEC de estudio respecto a cultivos en 2D. Con lo anterior pudimos demostrar que existen diferencias significativas en los perfiles de metilación de las células cultivadas en 2D y 3D sugiriendo la necesidad de implementar cultivos celulares que asemejen más la realidad de un tumor *in vivo*

Con la metodología de microinyección de células tumorales en el saco vitelino del embrión de 2 días después de la fertilización, demostramos que este organismo es un buen modelo para el estudio de procesos como la invasión y metástasis, observamos que la diseminación metastásica de las células Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3 en los peces se logró a las 24 hpi (horas post-inyección) y que la diseminación tumoral máxima se logró durante este tiempo en la mayoría de los casos, sin un aumento significativo en los horas y días posteriores. También pudimos estandarizar el número idóneo de células (250 células) que se deben inyectar en el pez para poder ver efectos de metástasis sin comprometer la viabilidad de los animales. Previamente, en la literatura ya se ha descrito a grosso modo como es el fenotipo invasivo y metastásico en cáncer de mama de las líneas celulares según el subtipo molecular en que se clasifican, sin embargo, al realizar estos ensayos de migración e invasión en el pez pudimos observar algunas particularidades que no se habían reportado antes como la gran capacidad que tienen las células BT-474 para hacer metástasis e invasión siendo una línea celular luminal.

Lo anterior resulta importante a la hora de clasificar a las líneas celulares de estudio pues con lo aquí reportado se podrían abordar diferentes terapias para el tratamiento de pacientes al reclasificar algunas líneas celulares que en la literatura hasta ahora son consideradas como de bajo potencial invasivo y metastásico como la línea BT-474.

Una vez entonces que evidenciamos las diferencias fenotípicas entre nuestras líneas celulares de estudio, se procedió al análisis por microarreglos de metilación, la particularidad de este tipo de ensayo es que las sondas diseñadas para discriminar las regiones metiladas nos permitieron identificar sitios completamente, medianamente metilados o menos metilados entre sí. En esta investigación nos centramos en el análisis de metilación a nivel de promotor pues a consecuencia de la presencia de patrones de metilación aberrante se puede afectar la expresión génica. Después de nuestro análisis de metilación diferencial pudimos demostrar que el perfil de metilación se ve afectado por el método de cultivo utilizado y que existen diferencias significativas que permitirán entonces realizar asociaciones con el nivel de expresión de genes de interés.

Nuestros resultados permitieron agrupar genes afectados por metilación del promotor como hipermetilados e hipometilados y clasificarlos por línea celular. Para la línea celular SK-BR-3 encontramos 1513 regiones metiladas diferencialmente que incluían promotores de genes anotados funcionalmente, RNAs no codificantes y algunos sitios en el genoma no anotados, el patrón de metilación indicó que en su mayoría los genes estaban hipermetilados y que dentro de estos estaban algunos relacionados a invasión y migración celular como RAK1, TMEM204, ICAM1, BUB3, entre otros y esto se correlaciona con lo que observamos en nuestro organismo modelo ya que por la influencia de la reprogramación epigenética la capacidad metastásica e invasiva podría estar reduciéndose en estas células. Para la línea celular BT-474 y Hs-578-T pudimos identificar que había más genes hipometilados que enriquecían vías y procesos asociados a invasión y migración celular como: RAP11A, FRDM5, CDH9, med12l, RECK1, por mencionar algunos y estos resultados también nos hablan de manera en

que el microambiente podría estar modificando la expresión génica por procesos epigenéticos.

Siguiendo con esta línea de investigación, entonces decidimos agrupar los genes metilados de manera diferencial en cada una de nuestras líneas celulares para identificar posibles genes HUB que pudieran tener algún rol central en la modulación de procesos metastásicos e invasivos en nuestras células de estudio. Así entonces, identificamos que 70 genes se compartían entre nuestras líneas celulares de estudio: NHLRC2, RFC1, ALG1, RHOBTB3, CLEC4E, CTA-211A9-5, SRFBP1, PYROXD2, VANGL1, RP11-18, RP11-86A5-1, EBLN2, AL592494-4, TNFSF12, KLHL24, C8orf75, LAG3, XAGE5, APCDD1L, SETD2, RP11-665G4-1, RPS11P6, VWA5B1, RP11-307L3-4, ME1, PTPLB, FRMD7, MCTS1, RP3-438O4-4, BUB3, RP11-122C5-1, SLC39A14, TMEM204, ITFG1, AC009784-3, ST7-AS2, C5orf25, PYGM, NCL, MICAL2, ZNF346, RBMX, MCOLN1, CENPE, DSPP, SRPX, CTB-131B5-5, KDM5B, ZDHHC20-AS1, RP11-316I3.1, SDAD1, USP44, TBC1D2B, CDH9, RPL34, RP11-342M3.5, MIR770, SAE1, WHSC1, RN5S338, LCE4A, ICAM1, SPP1, RP1-15D23.2, AGR2, RP11-436A20.4, FDXR, DCTD y GLT25D2. Lo anterior resulta importante porque pudimos determinar que estos genes participan en procesos biológicos importantes como la reparación del ADN, regulación del ciclo celular, localización de proteínas al retículo endoplásmico, autofagia, respuesta inmune innata, metabolismo de nucleótidos, remodelación del citoesqueleto y más interesante aún es que varios de estos genes están involucrados en procesos como proliferación, invasión, metástasis apoptosis en cáncer. Entonces al realizar una revisión meticulosa de la literatura de los genes hiper e hipometilados que se compartieron entre las líneas celulares para identificar los posibles roles de dichos genes en la progresión del cáncer de mama y si bien la mayoría de estos genes ya están reportados encontramos una particularidad en el gen USP44, pues en los pocos reportes en los que se ha hecho referencia a este gen se ha postulado que posee un rol dual actuando como oncogén o supresor tumoral en el contexto de cáncer. En el caso de Zhi Yao y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de USP44 contribuye a aumentar la capacidad metastásica de células madre de cáncer de mama y exacerba procesos angiogénicos, por su parte Lan y colaboradores demostraron que el agotamiento de USP44 afecta la invasividad de las

células MDA-MB-231, exhibiendo la importancia que tiene USP44 para mediar la invasividad eficiente de las células de cáncer de mama triple negativo, además se ha planteado que esta proteína podría estar regulando la represión de la expresión génica de genes objetivo pues pertenece al complejo correpressor de nuclear N-CoR que anteriormente se describió como uno de los lectores de las marcas de metilación en el ADN, así entonces se ha generado un modelo que nos habla de que la metilación en el ADN podría ser solo una plataforma inicial para la regulación de la expresión génica pues en conjunto con la interacción de lectores de las marcas de metilación que reclutan complejos remodeladores de la cromatina, anomalías en la función de las DNMTs y defectos o mutaciones en las TETs podemos apreciar que el paisaje epigenético es más complejo de lo que se ha reportado.

Por último, es importante destacar que la colección de datos de expresión de bases de datos biológicas para el cáncer como TCGA nos permitió verificar lo descrito en la literatura respecto a la expresión de USP44 en un contexto de cáncer y de esta manera propusimos a este gen como blanco de estudios funcionales ya que como se observó su expresión cambia entre las diferentes líneas celulares cáncer de mama y junto a los resultados que obtuvimos en donde su promotor se hipometila sugiriendo que este gen se sobreexpresa podría estar siendo un actor principal en los procesos invasivos y metastásicos de tal manera que proponemos se realicen investigaciones sobre esta proteína desde una perspectiva epigenética para elucidar si su expresión está relacionada al aumento de la capacidad metastásica de células de cáncer de mama.

10. Conclusiones

Los métodos clásicos de estudio del cáncer han evidenciado la biología de esta enfermedad, sin embargo, no cubren todos los aspectos necesarios para recapitular la biología tumoral *in vivo*, por esta razón, es importante poner a punto metodologías que incluyan el uso de organismos modelo o metodologías *in vitro* como los cultivos en tres dimensiones para asemejar más la fisiología tumoral *in vivo* y clasificar de mejor manera las diferentes líneas celulares para estudiar los hallmarks del cáncer a menor coste y tiempo.

La evidencia emergente ha sugerido que los cambios epigenéticos aberrantes, como la metilación del ADN, representan un mecanismo importante que impulsa el inicio y la progresión tumoral y que puede afectar también otros hallmarks del cáncer como la invasión y metástasis. Debido a su naturaleza dinámica en respuesta a cambios fisiológicos y estímulos microambientales, la metilación del ADN ha servido como un biomarcador potencial asociado con el pronóstico del cáncer y la resistencia a los medicamentos, sin embargo, es necesario realizar estudios a mayor profundidad que permitan evidenciar patrones de metilación aberrantes asociados a la expresión genética. En este sentido hay que recalcar que la metilación actúa como una plataforma de interacción para más mecanismos epigenéticos (modificaciones de la cromatina y modificaciones postraduccionales de histonas, por ejemplo) que en su conjunto actúan para mediar la regulación de la expresión génica.

Así pues, el uso de cultivos 3D nos permitirá caracterizar mejor la dinámica del paisaje epigenético de la metilación del ADN al evidenciar cambios en respuesta a modificación en el método de cultivo y la respuesta terapéutica para traducir mejor y más rápidamente los resultados básicos en terapias clínicas y personalizadas en cáncer.

Nuestro análisis mostró que, existen diferencias significativas en los patrones de metilación cuando se comparan células cultivadas en 2D y 3D, así mismo generamos patrones de metilación para las líneas celulares Hs-578-T, BT-474 y SK-BR-3 que son una herramienta indispensable para encontrar potenciales blancos terapéuticos y que evidencian la necesidad de usar modelos de cultivo celular más apegados a la fisiología tumoral como los cultivos celulares organotípicos en 3D, esto está respaldado por la evidencia que con esta investigación obtuvimos mediante nuestro estudio de invasión y migración *in vivo* en donde el proceso metastásico se potencializa.

Con los resultados del análisis de metilación a través de todo el genoma pudimos identificar genes afectados por metilación del ADN que se comparten entre nuestras líneas celulares de estudio y que podrían estar siendo genes Hub o reguladores maestros en procesos como la invasión y metástasis. De interés particular fueron los genes hipermetilados: Rpl34, Rp11342m35, Mir770, Sae1, Whsc1, Rn5s338, Lce4a, Icam1, Spp1, Rp115d232, Agr2, Rp11436a204, Fdxr, Dctd, GLT25D2y los genes hipometilados KDM5B, ZDHHC20-AS1, RP11-316I3-1, SDAD1, USP44, TBC1D2B, CDH9.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos han permitido proponer a USP44 como blanco de análisis funcional por su potencial como oncogén y supresor tumoral en cáncer de mama pues consideramos es importante elucidar su papel en el contexto de cáncer entre los diferentes subtipos de cáncer de mama y estudiar su papel en la regulación epigenética.

11. Perspectivas

- Silenciar la proteína USP44 para identificar si esto contribuye a la disminución de la capacidad metastásica e invasiva en células de cáncer de mama.
- Analizar el estado de metilación del promotor del gen USP44 con primers que permitan discriminar entre hipermetilación e hipometilación.
- Realizar un análisis funcional *in vitro* e *in vivo* del silenciamiento de USP44 y evaluar su impacto en diferentes Hallmarks del cáncer.

- Correlacionar el estado de expresión de USP44 con la modulación epigenética por metilación del ADN.

12. Bibliografía

1. Acuña, L, Aibar, S, Cerna, C, Cullen, C y otros. (2014). Manual de enfermería oncológica, Instituto Nacional del Cáncer. [En línea].
2. Astell, K. R., y Sieger, D. (2019). Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(8), a03707.
3. Batra, R. N., Lifshitz, A., Vidakovic, A. T., Chin, S. F., Sati-Batra, A., Sammut, S. J., Provenzano, E., Ali, H. R., Dariush, A., Bruna, A., Murphy, L., Purushotham, A., Ellis, I., Green, A., Garrett-Bakelman, F. E., Mason, C., Melnick, A., Aparicio, S. A. J. R., Rueda, O. M., Caldas, C. (2021). DNA methylation landscapes of 1538 breast cancers reveal a replication-linked clock, epigenomic instability and cis-regulation. *Nature Communications*, 12(1).
4. Bertram, J. F. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223.
5. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018), Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424.
6. Britto, D.D., Hall, C.J., Astin, J.W. In Vivo Imaging and Quantitation of the Host Angiogenic Response in Zebrafish Tumor Xenografts. *J. Vis. Exp.* (150), e59849, doi:10.3791/59849 (2019)
7. Campa, Víctor. (2017). Análisis de imágenes de microscopía con Image J. Create-Space Publishing. ISBN: 1542671309. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/313768335_Analisis_de_Imagenes_de_Microscopia_con_ImageJ
8. Chen, X., Li, Y., Yao, T., y Jia, R. (2021). Benefits of Zebrafish Xenograft Models in Cancer Research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*,
9. Cristall, K., Bidard, F. C., Pierga, J. Y., Rauh, M. J., Popova, T., Sebbag,

C., Lantz, O., Stern, M. H., y Mueller, C. R. (2021). A DNA methylation-based liquid biopsy for triple-negative breast cancer. *npj Precision Oncology*, 5(1).

10. Cheng, Y., He, C., Wang, M. et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Sig Transduct Target Ther* 4, 62 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>.
11. Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., y Liu, X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *npj Precision Oncology*, 2(1).
12. Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., y Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929–2943.
13. Darwiche N. (2020). Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *American journal of cancer research*, 10(7), 1954–1978.
14. Day, T. K., y Bianco-Miotto, T. (2013). Common gene pathways and families altered by DNA methylation in breast and prostate cancers. *Endocrine-Related Cancer*, 20(5), R215-R232.
15. Derakhshan, F., y Reis-Filho, J. S. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease*, 17(1), 181-204.
16. Ennour-Idrissi, K., Dragic, D., Durocher, F., y Diorio, C. (2020). Epigenome-wide DNA methylation and risk of breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer*, 20(1).
17. Ennour-Idrissi, K., Dragic, D., Durocher, F., y Diorio, C. (2020). Epigenome-wide DNA methylation and risk of breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer*, 20(1).
18. Ensenyat-Mendez, M., Llinàs-Arias, P., Orozco, J. I. J., Íñiguez-Muñoz, S., Salomon, M. P., Sesé, B., DiNome, M. L., y Marzese, D. M. (2021). Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most

- Aggressive Form of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11.
19. Ensenyat-Mendez, M., Llinàs-Arias, P., Orozco, J. I. J., Íñiguez-Muñoz, S., Salomon, M. P., Sesé, B., DiNome, M. L., y Marzese, D. M. (2021). Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11.
 20. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., y Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
 21. Fernandes, R.C.M. (2022). Molecular Basis of Breast Cancer. In: Kim Hsieh, S.J., Morris, E.A. (eds) *Modern Breast Cancer Imaging*. Springer, Cham.
 22. Fontana F, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P. In Vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 13;13(12):2970.
 23. Fontana, F., Marelli, M. M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., y Limonta, P. (2020). Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6806.
 24. Gamble JT, Elson DJ, Greenwood JA, Tanguay RL, Kolluri SK. The Zebrafish Xenograft Models for Investigating Cancer and Cancer Therapeutics. *Biology (Basel)*. 2021
 25. GLOBOCAN. (2020). Reporte de incidencia de canceres en mujeres de todas las edades 2020.
 26. Greenberg, M. V. C., y Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), 590-607.
 27. Han, L., Zheng, S., Sun, S., Huang, T. H., y Zhao, Z. (2010). Genome-Wide DNA Methylation Profiling in 40 Breast Cancer Cell Lines. *Lecture Notes in Computer Science*, 277–284.
 28. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
 29. Hao, Y., Baker, D., y Dijke, P. T. (2019). TGF- β -Mediated Epithelial-

- Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2767.
30. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K. J., Tsang, J., y Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1).
 31. Heredia-Mendez, A. J., Sánchez-Sánchez, G., y López-Camarillo, C. (2023). Reprogramming of the Genome-Wide DNA Methylation Landscape in Three-Dimensional Cancer Cell Cultures. *Cancers*, 15(7), 1991.
 32. Hill, D., Chen, L., Snaar-Jagalska, E., y Chaudhry, B. (2018). Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis. *F1000Research*, 7, 1682.
 33. Huang, W.; Hu, H.; Zhang, Q.; Wang, N.; Yang, X.; Guo, A.-Y. Genome-Wide DNA Methylation Enhances Stemness in the Mechanical Selection of Tumor-Repopulating Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 88.
 34. INEGI. (2020). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA.
 35. Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., y Searson, P. C. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 12.
 36. Katz, T. A., Huang, Y., Davidson, N. E., y Jankowitz, R. C. (2014). Epigenetic reprogramming in breast cancer: From new targets to new therapies. *Annals of Medicine*, 46(6), 397–408.
 37. 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., y 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.
 38. Khaled, y Bidet. (2019). New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the EMT of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers*, 11(4), 559.

39. Kristiansen, S., Jørgensen, L. M., Guldborg, P., y Sölétormos, G. (2013). Aberrantly Methylated DNA as a Biomarker in Breast Cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 28(2), 141–150.
40. Ko, K. R., Tsai, M. C., y Frampton, J. P. (2018). Fabrication of thin-layer matrigel-based constructs for three-dimensional cell culture. *Biotechnology Progress*, 35(1), e2733.
41. Koedoot, E., Wolters, L., Smid, M., Stoilov, P., Burger, G. A., Herpers, B., Yan, K., Price, L. S., Martens, J. W. M., le Dévédec, S. E., y van de Water, B. (2021). Differential reprogramming of breast cancer subtypes in 3D cultures and implications for sensitivity to targeted therapy. *Scientific Reports*, 11(1).
42. Kumar, R., Paul, A. M., Rameshwar, P., y Pillai, M. R. (2019). Epigenetic Dysregulation at the Crossroad of Women's Cancer. *Cancers*, 11(8), 1193.
43. Kurdyukov, S., y Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1), 3.
44. Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
45. Liu, X., Peng, Y., y Wang, J. (2020). Integrative analysis of DNA methylation and gene expression profiles identified potential breast cancer-specific diagnostic markers. *Bioscience Reports*, 40(5).
46. Loeza-Loeza, J., Beltran, A. S., y Hernández-Sotelo, D. (2020). DNMTs and Impact of CpG Content, Transcription Factors, Consensus Motifs, lncRNAs, and Histone Marks on DNA Methylation. *Genes*, 11(11), 1336.
47. Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., y Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287.
48. Martinez-Lopez, M., Póvoa, V., y Fior, R. (2021). Generation of Zebrafish Larval Xenografts and Tumor Behavior Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 172.

49. Martínez-Pena, I., Hurtado, P., Carmona-Ule, N., Abuín, C., Dávila-Ibáñez, A. B., Sánchez, L., Abal, M., Chaachou, A., Hernández-Losa, J., Cajal, S. R. Y., López-López, R., y Piñeiro, R. (2021). Dissecting Breast Cancer Circulating Tumor Cells Competence via Modelling Metastasis in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9279.
50. McSherry, E., Donatello, S., Hopkins, A., y McDonnell, S. K. (2007). Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(24), 3201-3218.
51. Meirson, T., Gil-Henn, H. y Samson, A.O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene* 39, 2024–2026 (2020).
52. Nandy, D., Rajam, S. M., y Dutta, D. (2020). A three-layered histone epigenetics in breast cancer metastasis. *Cell y Bioscience*, 10(1).
53. Neophytou, C., Boutsikos, P., y Papageorgis, P. (2018). Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 8.
54. Noble AJ, Pearson JF, Boden JM, Horwood LJ, Gemmell NJ, Kennedy MA, Osborne AJ. A validation of Illumina EPIC array system with bisulfite-based amplicon sequencing. *PeerJ*. 2021 Feb 10;9:e10762.
55. Ondeck, M.G.; Kumar, A.; Placone, J.K.; Plunkett, C.M.; Matte, B.F.; Wong, K.C.; Fattet, L.; Yang, J.; Engler, A.J. Dynamically stiffened matrix promotes malignant transformation of mammary epithelial cells via collective mechanical signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019, 116, 3502–3507.
56. Paatero, I., Alve, S., Gramolelli, S., et al. (2018). Zebrafish Embryo Xenograft and Metastasis Assay. *Bio-protocol* 8(18):e3027.
57. Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., van Djik, S., Muhlhausler, B., Stirzaker, C., y Clark, S. J. (2016). Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology*, 17(1).
58. Pidsley, R., Zotenko, E., Peters, T. J., Lawrence, M. G., Risbridger, G. P., Molloy, P., van Djik, S., Muhlhausler, B., Stirzaker, C., y Clark, S. J.

- (2016). Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biology*, 17(1).
59. Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., y Panosa, A. (2019). In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7.
60. Rakha, E. A., y Pareja, F. G. (2021). New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 102–113.
61. Rodenhiser, D. I., Andrews, J., Kennette, W., Sadikovic, B., Mendlowitz, A., Tuck, A. B., y Chambers, A. F. (2008). Epigenetic mapping and functional analysis in a breast cancer metastasis model using whole-genome promoter tiling microarrays. *Breast cancer research: BCR*, 10(4), R62.
62. Saha, T., Solomon, J. M., Samson, A. O., y Gil-Henn, H. (2021). Invasion and Metastasis as a Central Hallmark of Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 10(16), 3498.
63. Shi, J., Xu, J., Chen, Y., Li, J., Cui, Y., Shen, L., Li, J. J., y Li, W. (2021). The concurrence of DNA methylation and demethylation is associated with transcription regulation. *Nature Communications*, 12(1).
64. Shu, C., Zhang, X., Aouizerat, B. E., y Xu, K. (2020). Comparison of methylation capture sequencing and Infinium MethylationEPIC array in peripheral blood mononuclear cells. *Epigenetics y Chromatin*, 13(1).
65. Skok, K., Maver, U., Gradišnik, L., Sobočan, M., y Takač, I. (2019). Humane celične linije raka dojke. *Slovenian Medical Journal*, 88(9–10), 427–443.
66. Skvortsova, K., Stirzaker, C., y Taberlay, P. C. (2019). The DNA methylation landscape in cancer. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 797-811.
67. Stowers, R.S.; Shcherbina, A.; Israeli, J.; Gruber, J.J.; Chang, J.; Nam, S.; Rabiee, A.; Teruel, M.N.; Snyder, M.P.; Kundaje, A.; et al. Matrix stiffness induces a tumorigenic phenotype in mammary epithelium through changes in chromatin accessibility. *Nat. Biomed. Eng.* 2019, 3,

1009–1019.

68. Suresh, D. S., y Guruvayoorappan, C. (2023). Molecular principles of tissue invasion and metastasis. *American Journal of Physiology-cell Physiology*.
69. Szyf, M. (2012). DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Medicine*, 4(3), 26.
70. Tian, S., Bertelsmann, K., Yu, L., y Sun, S. (2016). DNA Methylation Heterogeneity Patterns in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Informatics*, 15s4, CIN.S40300.
71. Thuy, L. H. A., Thuan, L. D., y Phuong, T. K. (2017). DNA Hypermethylation in Breast Cancer. *Breast Cancer - From Biology to Medicine*.
72. Tsang, J. Y., y Tse, G. M. (2019). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35.
73. Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E., y Guan, J. L. (2021). Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 321(2), C343-C354.
74. Veronesi, U., Goldhirsch, A., Veronesi, P., Gentilini, O. D., y Leonardi, M. C. (2017). *Breast Cancer: Innovations in Research and Management (1st ed. 2017 ed.)*. Cham, Switzerland: Springer.
75. Weng, Y. I., Huang, T. H., y Yan, P. S. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: detection of DNA methylation in breast cancer cell lines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 590, 165–176.
76. Wild C. Prefacio. En: Stewart BW, Wild C. *World cancer report. 2020*. Lyon, France: IARC-WHO.
77. Wu, J. S., Jiang, J., Chen, B. J., Wang, K., Tang, Y. L., y Liang, X. H. (2021). Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology*, 14(1), 100899.
78. Yamada, K.M., Sixt, M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 738–752 (2019).
79. Yong, W. S., Hsu, F. M., y Chen, P. Y. (2016). Profiling genome-wide

DNA methylation. *Epigenetics y Chromatin*, 9(1).

80. Zhang, S., Wang, Y., Gu, Y., Zhu, J., Ci, C., Guo, Z., Chen, C., Wei, Y., Lv, W., Liu, H., Zhang, D. and Zhang, Y. (2018), Specific breast cancer prognosis-subtype distinctions based on DNA methylation patterns. *Mol Oncol*, 12: 1047-1060.
81. Zhou, W. M., Liu, B., Shavandi, A., Li, L., Song, H., y Zhang, J. Y. (2021). Methylation Landscape: Targeting Writer or Eraser to Discover Anti-Cancer Drug. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
82. Zolota, V.; Tzelepi, V.; Piperigkou, Z.; Kourea, H.; Papakonstantinou, E.; Argentou, M.-I.; Karamanos, N.K. Epigenetic Alterations in Triple-Negative Breast Cancer—The Critical Role of Extracellular Matrix. *Cancers* 2021, 13, 713.