

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Estudio de la función del eje LINC01087/miR-130a-  
3p/FOXA1 en la proliferación, migración y mimetismo  
vasculogénico en cultivos 3D de células  
de cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

**SANDRA LIZETH ALVARADO ORTIGOZA**

DIRECTOR: **DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO**

CODIRECTORA: **DRA. MIREYA CISNEROS VILLANUEVA**

POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS

Ciudad de México, noviembre de 2024.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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.

**COMITÉ DE CERTIFICACIÓN:**

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Plantel de Adscripción: Plantel del valle.

**DIRECTOR**

---

Dr. Mario César López Camarillo, UACM.

**CO-DIRECTORA**

---

Dra. Mireya Cisneros Villanueva, INMEGEN.

## **Agradecimientos**

A la UACM por ser una institución tan noble, de alta calidad de profesores e investigadores y por el apoyo brindado a este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada como apoyo a una servidora.

Al cuerpo de profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por compartir un poco del amplio conocimiento que poseen, así como el amor a la ciencia.

Al laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer, en el Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, específicamente al Dr. César López Camarillo, a quien le doy las gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como todo el apoyo y las enseñanzas brindadas.

A mis asesoras; Dra. Mireya, Dra. Alejandra, Dra. Elizabeth, gracias infinitas por apoyarme a darle rumbo a este proyecto y siempre impulsarme a dar más.

A mis lectoras; Dra. Ángeles, Dra. Helena, gracias por el tiempo que invirtieron en la lectura de mi tesis, así como a las correcciones que hicieron para hacer de este escrito de alto nivel.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología CONAHCYT. Proyecto A3-S-33674.

## Dedicatorias

A mis padres; Juan Roberto Alvarado Lucas y Guadalupe Ortigoza Gómez, por su amor y apoyo incondicional.

A los 4 pedazos de mi corazón (Gabriela, Diana, Roció y mi bomboncito Dulce); gracias por estar.

Por ustedes.

SIEMPRE

## CONTENIDO

Índice de tablas .....	8
Índice de figuras .....	9
Abreviaturas .....	11
Resumen .....	12
Abstract .....	13
I Introducción .....	14
1. Cáncer de mama .....	14
1.1 Cáncer y Hallmarks del cáncer .....	14
1.2 Glándula mamaria y Cáncer de mama .....	18
1.3 Epidemiología del cáncer de mama .....	20
1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama .....	21
1.5 Cultivos celulares de cáncer de mama .....	21
2. Cultivo celular tridimensional (3D) .....	23
2.1 Generalidades de los cultivos 3D .....	23
2.2 Cultivos celulares de cáncer de mama en 3D .....	24
2.3 Huellas de expresión génica de cultivos 3D vs 2D en cáncer .....	26
3. RNAs largos no codificantes (LNCRNAs) .....	28
3.1 lncRNA definición, biogénesis y clasificación .....	28
3.2 lncRNA como reguladores maestros de la expresión génica en múltiples niveles .....	30
3.3 Los lncRNAs regulan los procesos alterados en cáncer .....	32
3.4 RNA largo no codificante LINC01087 en cáncer de mama .....	34
3.4.1 Función del miR.130a-3p en cáncer de mama .....	37
3.4.2 FOXA1 en la progresión tumoral en cáncer de mama .....	38
II. Hipótesis .....	40
III. Justificación .....	41

IV. Objetivos .....	42
4.1 Objetivo general .....	42
4.2 Objetivos particulares .....	42
V. Estrategia experimental.....	43
VI. Materiales y métodos .....	44
6.1 Cultivos celulares en 2D.....	44
6.1.2 Generación de cultivos celulares en 3D .....	44
6.2 Transfección del siRNA lncRNA-SNHG7 en cultivos en 2D.....	44
6.2.2 Transfección del siRNA lncRNA-SNHG7 en cultivos en 3D .....	44
6.3 Extracción del RNA total de los cultivos en 3D y 2D de la línea celular BT-474	45
6.4 Tratamiento con DNAsa.....	45
6.5 qRT-PCR en tiempo real .....	46
6.6 Ensayo de viabilidad celular en los cultivos 2D y 3D transfectados con si-LINC01087 .....	46
6.7 Ensayo de Migración celular en cultivos 2D.....	47
6.8 Ensayos de proliferación celular en cultivos 2D y 3D de células BT-474 transfectadas con si-LINC01087 .....	47
6.9 Ensayos de mimetismo vasculogénico.....	47
6.10 Transfección del precursor del miR-130a-3p en cultivos 3D .....	48
6.11 Western blots .....	48
6.12 Análisis estadístico.....	48
6.12. Analisis in silico de la expresión de LINC01087 .....	49
VII. Resultados .....	50
7.1 La expresión génica de LINC01087 es variable en los diferentes tipos de cáncer y en los subtipos moleculares del cáncer de mama.....	50
7.2 La sobreexpresión del LINC01087 predice un menor tiempo de vida en las pacientes con cancer de mama .....	54
7.3 miR-130a-9p se encuentra subexpresado mientras la expresión de la proteína FOXA1 se muestra elevada en BC .....	55
7.4 Las células transfectadas con el si-LINC01087 crecidas en 2D y 3D muestran un decremento de la disminución de LINC01087 .....	57
7.5 Las células BT-474 crecidas en 3D transfectadas con si-LINC01087 muestran un cambio en la formación de esferoides .....	58

7.6 Determinación del efecto funcional de la deficiencia de LINC01087 .....	61
7.6.1 La deficiencia de la expresión del LINC01087 impacta en la viabilidad de las células BT-474 crecidas en 2D y 3D	61
7.6.2 Las células si-LINC01087 disminuyen la capacidad proliferativa celular en cultivos crecidos en 2D y 3D	63
7.6.3 El silenciamiento de la expresión del LINC01087 disminuye significativamente la migración celular de la línea BT-474 de cáncer de mama en 2D	64
7.6.4 La disminución de la expresión de LINC01087 en células de BC subtipo luminal B inhibe la formación de mimetismo vasculogénico en un ambiente tridimensional	66
7.6.5 Efecto del silenciamiento de LINC01087 y de la sobreexpresión del miR-130a-3p sobre la abundancia de la proteína FOXA1 en la línea celular de BC subtipo luminal B crecidas en 3D	69
VIII. Discusión .....	72
IX. Conclusión .....	75
X. Perspectivas.....	77
Bibliografía.....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. IncRNAs identificados en cáncer de mama .....	32
Tabla 2. Secuencia de los cebadores diseñados para amplificar LINC01087 .....	46
Tabla 3. Tabla de restricciones para la generación de la gráfica de sobrevida.....	49

## **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Origen celular de vasos sanguíneos en tumores sólidos

**Figura 2.** Estructura de la glándula mamaria

**Figura 3.** Epidemiología del cáncer de mama.

**Figura 4.** Comparación de las líneas celulares en cáncer de mama respecto a su pronóstico clínico

**Figura 5.** Morfología de líneas celulares de cáncer de mama cultivadas en 3D

**Figura 6.** Perfil de expresión de miRNAs cultivados en condiciones 2D y 3D de células de cáncer de mama Hs578T

**Figure 7.** Perfil de expresión de RNAs largos no codificantes en células de cáncer de mama BT-474.

**Figura 8.** Red de correulación LINC01087/hsa-miR-130a-3p/FOXA1.

**Figura 9.** Funciones principales de la proteína FOXA1 en cáncer de mama.

**Figura 10.** Perfil de la expresión génica del LINC01087 en tejido sano y tumoral en pan cáncer.

**Figura 11.** Expresión génica del LINC01087 en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer.

**Figura 12.** Perfil de expresión del LINC01087 en los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama.

**Figura 13.** Análisis de supervivencia en pacientes con BC con sobreexpresión de LINC01087

**Figura 14.** Expresión de las moléculas involucradas en el eje de correlación LINC01087/miR130a-3p/FOXA1 en BC

**Figura 15.** Expresión de LINC01087 en células transfectadas con si-LINC01087

**Figura 16.** La deficiencia de LINC01087 disminuye el tamaño y número de esferoides de las células BT-474

**Figura 17.** La deficiencia de LINC01087 disminuye el tamaño y número de esferoides de las células BT-474.

**Figura 18.** La deficiencia de LINC01087 impacta en la viabilidad celular en la línea BT-474.

**Figura 19.** La deficiencia de LINC01087 disminuye la capacidad proliferativa de las células de cáncer de mama.

**Figura 20.** Migración celular de células si-LINC01087.

**Figura 21.** El Silenciamiento de LINC01087 inhibe el mimetismo vasculogénico en células de cáncer de mama luminal B

**Figura 22.** Inmunodetección de la proteína FOXA1.

## ABREVIATURAS

lncRNA	RNA largo no codificante
siRNA	small interfering RNA
miRNA	Micro RNA
Nt	Nucleótido
BC	Cáncer de mama
TNCB	Cancer de mama triple negativo
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular
MEC	Matriz extracelular
VE-cadherin	Cadherina endotelial vascular
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CLI	Carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2
ER	Receptor de estrógeno
PR	Receptor de progesterona
TME	Microambiente tumoral
MB	Membrana basal
smORF	Pequeños marcos de lectura abierta
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNasa P	Ribonucleasa P
TF	Factor de transcripción
MAML1	mastermind-like protein 1
MEF2C	myocyte-specific enhancer factor 2C
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
CDK4	Quinasa dependiente de ciclina 4
AR	Receptor de Andrógenos

## RESUMEN

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) son moléculas reguladoras de >200 nt de longitud que no tienen un marco de lectura abierto, por lo que no tienen la capacidad de codificar proteínas. Los lncRNA funcionan como reguladores maestros de la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional y su desregulación se ha relacionado con el cáncer. En los últimos años, la implementación de cultivos celulares tridimensionales (3D) ha revolucionado el estudio del cáncer. Los cultivos 3D se caracterizan por utilizar andamiajes de matrigel enriquecidos en proteínas de la matriz extracelular que promueven la formación de estructuras 3D de células cancerosas. Estas estructuras 3D pueden formar gradientes tanto de nutrientes como de oxígeno simulando un entorno celular como los tumores *in vivo*. Recientemente informamos de un perfil de expresión de lncRNA en todo el genoma en células de cáncer de mama BT-474 luminal subtipo B cultivadas en un microambiente 3D. En particular, el lncRNA LINC01087 se sobreexpresó en cultivos 3D en comparación con cultivos 2D en monocapa. En la presente investigación, estudiamos el papel funcional del eje de correulación LINC01087/miR 130a-3p/FOXA1 en células de cáncer de mama cultivadas en 2D y 3D. El silenciamiento de LINC01087 en cultivos 2D y 3D utilizando siRNAs resultó en una disminución de la viabilidad celular, la proliferación y la migración, así como en el deterioro de las capacidades de mimetismo vasculogénico. En cultivos 3D, las células deficientes en LINC01087 mostraron un fenotipo anormal (con respecto a la morfología reportada en la literatura), las células se observaron con un contorno rugoso y tortuoso. Además, las células deficientes en LINC01087 mostraron un cambio significativo en el tamaño y el número de estructuras 3D en comparación con las células no tratadas. Además, tanto las células deficientes en LINC01087 como las células que sobreexpresan miR130a-3p mostraron una menor abundancia de la proteína FOXA1, el objetivo previsto de miR130a-3p. Estos datos sugieren que los procesos celulares afectados pueden estar regulados indirectamente por el eje LINC01087/miR-130a-3p/FOXA1. En conclusión, LINC01087 es una molécula clave importante en la modulación de algunas características del cáncer de mama en cultivos en monocapa 2D así como en 3D, lo que sugiere que podría ser un objetivo terapéutico potencial en terapias contra el cáncer de mama.

## **ABSTRACT**

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are regulatory molecules of >200 nt length that do not have an open reading frame, so they can't encode proteins. lncRNAs function as master regulators of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels, and their deregulation has been linked to cancer. Implementing three-dimensional (3D) cell cultures has revolutionized cancer studies in recent years. 3D cultures are characterized by matrigel scaffolds enriched in extracellular matrix proteins, which promote the formation of 3D structures of cancer cells. These 3D structures can form gradients of both nutrients and oxygen, simulating a cellular environment like tumors in vivo. We recently reported a genome-wide expression profile of lncRNAs in BT-474 luminal B subtype breast cancer cells grown in a 3D microenvironment. Remarkably, the lncRNA LINC01087 was overexpressed in 3D cultures compared to monolayer 2D cultures. In the present investigation, we studied the functional role of LINC01087/miR 130a-3p/FOXA1 co-regulation axis in breast cancer cells grown in 2D and 3D. The silencing of LINC01087 in 2D and 3D cultures using siRNAs resulted in decreased cellular viability, proliferation, and migration and in the impairment of vasculogenic mimicry abilities. In 3D cultures, the LINC01087-deficient cells showed an abnormal phenotype; the cells were observed with a rough and tortuous contour. Moreover, LINC01087-deficient cells showed a significant change in the size and number of 3D structures compared to untreated cells. In addition, both LINC01087-deficient cells and cells that overexpress miR130a-3p showed a lower abundance of the FOXA1 protein, the predicted target of miR130a-3p. These data suggest that the affected cellular processes may be indirectly regulated by the LINC01087/miR-130a-3p/FOXA1 axis. In conclusion, LINC01087 is a key molecule important in the modulation of some hallmarks of breast cancer in 2D monolayer cultures and in 3D, suggesting that it could be a potential therapeutic target in breast cancer therapies.

# I INTRODUCCIÓN

## 1. Cáncer de mama

### 1.1 Cáncer y características del cáncer

El cáncer es un término que agrupa a un conjunto de patologías relacionadas entre sí, en donde la característica principal es el crecimiento anormal y descontrolado de las células, las cuales poseen la capacidad de diseminarse a otros órganos. Estas células suelen presentar alteraciones en su genoma que pueden ir desde mutaciones puntuales hasta mutaciones en múltiples sitios en diversos genes (Roy and Saikia, 2016).

La teoría mutacional del cáncer afirma que existen mutaciones “impulsoras” las cuales promueven la capacidad proliferativa de las células, estas mutaciones impulsoras se generan mediante múltiples procesos, entre los que destacan, la exposición a mutágenos endógenos y exógenos, edición aberrante del DNA y errores en el proceso de replicación del DNA, estos procesos dan como resultado la expresión de oncogenes con función dominante y genes supresores de tumores con pérdida de función recesiva.(Nik-Zainal *et al.*, 2016).

Partiendo de los cambios dinámicos que ocurren en el genoma de las células cancerosas, un grupo de investigadores proponen seis alteraciones esenciales en la fisiología celular (Hanahan and Weinberg, 2000) que ocurre en los más de 100 tipos distintos de cáncer, sin embargo, conforme las técnicas de estudio molecular avanzan, se han incorporado más alteraciones fisiológicas. En la actualidad se conocen 14 procesos que se alteran en el funcionamiento fisiológico de la célula conocidos como las características del cáncer, lo cuales proporcionan un amplio y claro comportamiento de un crecimiento maligno (Hanahan, 2022).

#### ***Características del cáncer***

Como se mencionó en el apartado anterior, las células cancerosas conforme van proliferando son capaces de presentar un conjunto capacidades adquiridas que conducen a una ruptura o alteración en los mecanismos de defensa integrados en todas las células, los cuales se encargan de mantener la homeostasis celular. A

continuación, se hará una breve descripción de las cinco características más representativas.

- **Autosuficiencia en señales de crecimiento.**

La autosuficiencia en las señales de crecimiento es una capacidad adquirida en células cancerosas y su importancia radica en la reducción de la capacidad de percepción de la estimulación exógena del crecimiento lo que resulta en una alteración en la homeostasis celular y, a su vez, proporciona autonomía para que las células cancerosas generen sus propias señales de crecimiento mitogénico (factores mitogénico y sustratos para integrinas) a través de un circuito de estimulación autocrina, es decir, en células sanas la percepción de estos factores son cruciales para la proliferación celular. (Hanahan and Weinberg, 2000).

- **Insensibilidad a las señales anti-crecimiento**

La insensibilidad a las señales anti-crecimiento es una capacidad adquirida en las células cancerosas y es un proceso clave para la proliferación y posterior diseminación celular. Las células tumorales desarrollan esta capacidad mediante mecanismos genéticos (mutación, delección) y epigenéticos (metilación, acetilación) al evadir a las moléculas supresores de tumores (Amin *et al.*, 2015). Por ejemplo, la disminución de la expresión de *P16INK4A* lleva a una rápida y fácil activación de CDK4 (quinasa dependiente de ciclina 4) que es dependiente de ciclina 6. Estas moléculas se encargan de la activación de la proteína Rb lo que lleva a una transcripción por E2F de genes que se encuentran implicados en la entrada al ciclo celular, por ejemplo, la transcripción del gen p16 (impulsado por E2F) impacta en la progresión del ciclo celular desde la fase G1 y su transición a la fase S (Veganzones-de-Castro *et al.*, 2012). La inhibición de E2F mediante pRb resulta en la supresión de la progresión del ciclo celular, la replicación del DNA, la apoptosis entre otros (Classon and Harlow, 2002).

- **Evasión de la apoptosis**

Las células tumorales poseen la capacidad de activar mecanismos extraordinarios para evadir la apoptosis. La estrategia más estudiada es la disminución de la expresión del gen supresor de tumores por excelencia *P53*, la cual se ha observado en más del 50% de los cánceres humanos (Sharma, Boise and Shanmugam, 2019).

Se tiene conocimiento de dos vías que desembocan en una muerte celular programada; la extrínseca e intrínseca. Particularmente la vía intrínseca se altera en las células cancerosas, ya que está regulada por el metabolismo celular. La vía intrínseca resulta en la activación de proteasas específicas de cisteína aspartil y su función radica en escindir proteínas que conducen a una muerte celular, esta vía se encuentra regulada fuertemente por el equilibrio de proteínas de la familia BCL-2 pro y anti apoptóticas (Sharma, Boise and Shanmugam, 2019). Específicamente en las células tumorales las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas se encuentran en abundancia mientras que las proteínas BH3 proapoptóticas se subexpresan, estas últimas proteínas evitan el inicio de la maquinaria apoptótica. A pesar de contar con este mecanismo, las células tumorales son susceptibles a la apoptosis debido a su heterogeneidad celular (Yip and Reed, 2008).

#### - **Angiogénesis sostenida**

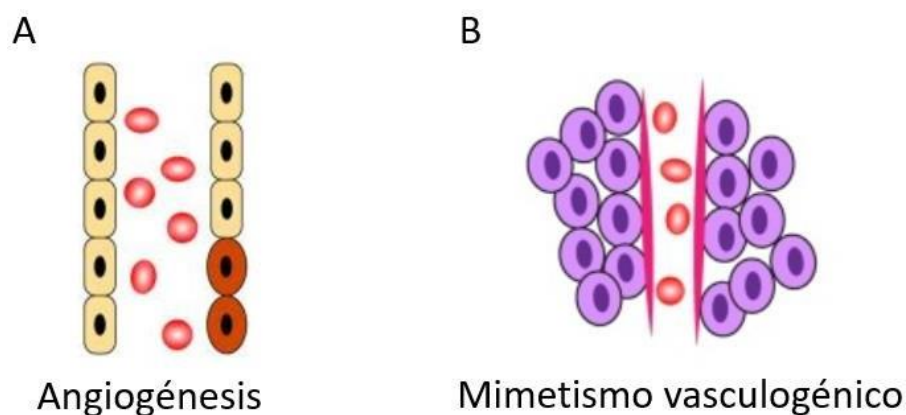
La angiogénesis es la capacidad que poseen las células cancerosas para realizar su propia vascularización, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente. Este proceso es clave para la progresión tumoral, ya que permite que las células capturen tanto oxígeno como nutrientes que promueven la proliferación descontrolada (Hanahan and Weinberg, 2000)

A pesar de que este proceso ocurre de manera natural y sumamente controlado en condiciones fisiológicas y en estados como embriogénesis y el ciclo menstrual, las células tumorales se encuentran realizando este proceso sostenidamente. Molecularmente este proceso se da por un desequilibrio entre los factores estimuladores (Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF-A) e inhibidores, (anticuerpos monoclonales que reconocen a VEGF, adhiriéndose a él y evitando la activación de su receptor), estos, aunados al microambiente tumoral es lo que lleva a un estado pro angiogénico (Saman *et al.*, 2020).

VEGF es una molécula sumamente importante debido a que regula a las células madre mesenquimales cancerosas (CMM). Las CMM son las encargadas de suprimir el crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis, induciendo el arresto del ciclo celular y la apoptosis, por lo tanto es crucial en el inicio de la tumorigénesis contribuyendo a la transición epitelio-mesenquimal (Moradi-Gharibvand and Hashemibeni, 2023), esta

transición lleva a la secreción de enzimas proteolíticas como las metaloproteasas de la matriz extracelular (MEC) así como una pérdida de polaridad celular y a posteriores cambios citoesqueléticos, lo que resulta en un aumento en la motilidad celular y la pérdida de la E-cadherina, por lo que se ha observado una menor adhesión celular, provocando así, un aumento en la supervivencia y proliferación celular (Fantozzi *et al.*, 2014).

Recientemente se ha relacionado el proceso molecular que ocurre en la angiogénesis con el mimetismo vasculogénico, el cual es un proceso vital para la progresión tumoral. El mimetismo vasculogénico es un proceso de microcirculación tumoral propuesto por Maniotis y colaboradores en 1999 (Maniotis *et al.*, 1999). A pesar de que tanto la angiogénesis como el mimetismo vasculogénico tienen como objetivo la formación de vasos sanguíneos para el suministro de sangre en los tumores sólidos la diferencia entre uno y otro radica en el origen de estos vasos sanguíneos (Figura 1). En el mimetismo vasculogénico la formación de los vasos sanguíneos no depende de las células endoteliales como en la angiogénesis clásica, si no que existen varios mecanismos a los que se le atribuye esta formación de canales como la transición epitelial-mesenquimatoso, por ejemplo, las células madres cancerosas, así como diversas vías de señalización como la de la cadherina endotelial vascular (VEC), fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), metaloproteasas, entre otras (Luo *et al.*, 2020). En general el mimetismo vasculogénico se ha relacionado con un mal pronóstico en pacientes con tumores malignos, a su vez, se ha correlacionado positivamente con la progresión tumoral, invasión y metástasis (Liu *et al.*, 2016)

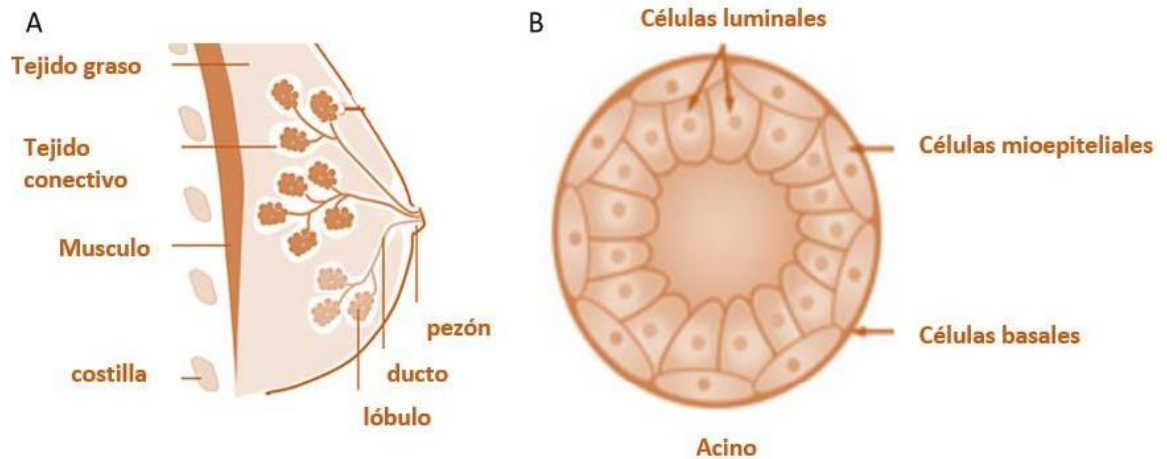


**Figura 1. Origen celular de vasos sanguíneos en tumores sólidos.** A. Angiogénesis; Se reclutan células progenitoras endoteliales (células rojas) y células endoteliales (amarillas) para la formación de los vasos sanguíneos tumorales. B. Mimetismo vasculogénico; Este sistema de microcirculación no depende de las células endoteliales, se encuentran revestidas por células tumorales similares a las células endoteliales (células moradas). Tomada y modificada de Luo, *et al*, 2020.

## 1.2 Glándula mamaria y cáncer de mama

La glándula mamaria es un órgano muy dinámico que se encarga de procesos tales como la lactancia por lo que se encuentra en constante cambio desde la embriogénesis hasta la menopausia. Este órgano se compone de una serie de conductos ramificados que conectan, a los acinos (unidades glandulares funcionales) con el pezón, posee varios tipos de células diferentes como son las células epiteliales que crecen desde el pezón hasta la almohadilla de grasa formada por adipocitos (Figura 2) y que a su vez es infiltrada por células endoteliales vasculares, fibroblastos y células del sistema inmune innato. Además, el epitelio mamario se encuentra compuesto por dos tipos celulares; las células basales y las células luminales (Vidi, Bissell and Lelièvre, 2012)

El epitelio basal consta de células mioepiteliales las cuales tienen la función de formar una capa externa de la glándula que a su vez posee una población reducida de células madre, también se ha observado que posee propiedades contráctiles para la expulsión de leche en la lactancia, mientras que el epitelio luminal es el encargado de formar los conductos y alveolos secretores mamarios, también se ha observado que posee poblaciones específicas dependiendo de su receptor hormonal (Thomas, 2011; Macias and Hinck, 2012).

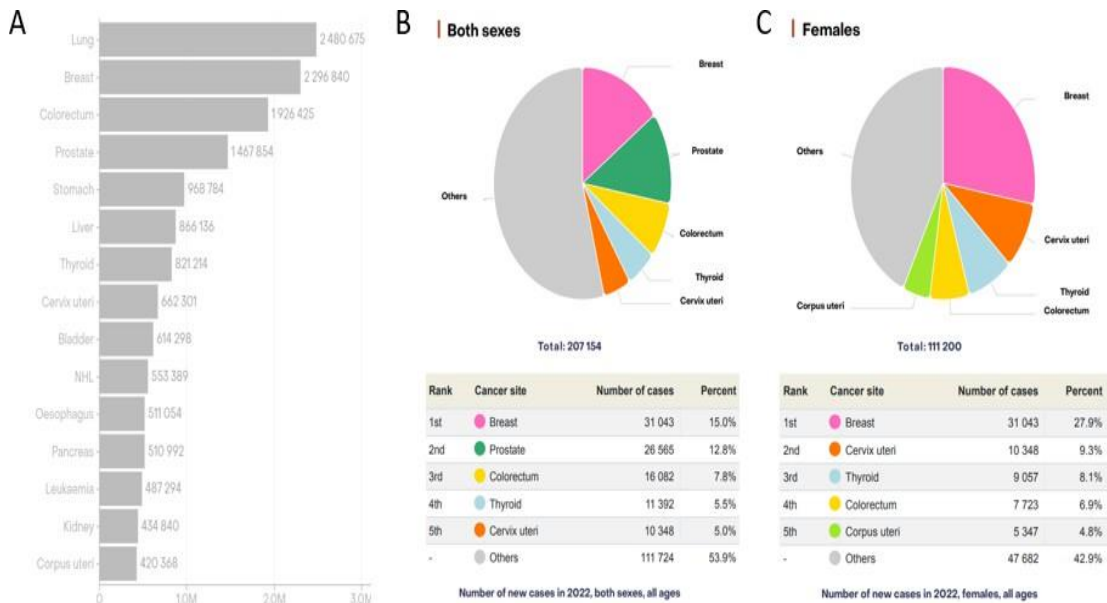


**Figura 2. Estructura de la glándula mamaria. A.** La mama está compuesta de dos tipos principales de tejidos: el estromal, que incluyen los tejidos conectivos grasos y fibrosos como soporte, y el tejido glandular, formado por un sistema de conductos formados por múltiples acinos. **B.** Los acinos se encuentran formados por dos tipos de células: las luminales y células mioepiteliales. Tomado y modificado por (Thomas, 2011).

La heterogeneidad celular en la glándula mamaria, es la causa por la que el cáncer de mama es una enfermedad compleja que engloba y describe a un conjunto de neoplasias malignas por lo que el cáncer de mama es clasificado según diversos aspectos. Una de sus clasificaciones depende de la procedencia de las células que presentan alteraciones a nivel genómico, el cáncer de mama se clasifica como *in situ* e invasivo; cuando el cáncer de mama se diagnostica *in situ* las células tumorales no han atravesado la membrana basal, mientras que en el invasivo estas células tumorales han logrado infiltrarse a otros tejidos (Cserni, 2020). Los carcinomas que se desarrollan en la mama generalmente provienen de las células que se encuentran revistiendo los conductos galactóforos, se conoce como carcinoma ductal invasivo o infiltrante (CDI), que representan alrededor del 80% de los casos diagnosticados mientras que el 20% restante representa al carcinoma que se producen en las células que conforman los acinos mamarios denominado como carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante (CLI) (Chen *et al.*, 2017).

### 1.3 Epidemiología del cáncer de mama

En la actualidad el cáncer de mama se encuentra entre los tres cánceres con mayor tasa de incidencia a nivel mundial (Figura 3A). Particularmente, en México, cuando se analiza la incidencia de tumores en ambos sexos, el cáncer de mama ocupa el primer lugar por encima del cáncer de próstata y de colón (Figura 3B). Específicamente en mujeres, cifras obtenidas en el año 2023 (Siegel *et al.*, 2023), a través de la plataforma GLOBOCAN indicaron 31 043 casos confirmados, lo que representa un 27.9% de todos los tipos de cáncer y de estos casos nuevos 8 195 casos terminaron en la defunción de la paciente (Figura 3C). Estos datos indican que el cáncer de mama representa un grave problema de salud pública por lo que su estudio es indispensable para la elusión de los procesos que se ven alterados en esta neoplasia.



**Figura 3. Epidemiología del cáncer de mama.** A) Incidencia de cáncer de mama a nivel mundial B) Incidencia de cáncer de mama en hombres y mujeres; México C) Incidencia de cáncer de mama en mujeres; México. Adaptado de ( Siegel *et al.*, 2023).

#### **1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama**

El enfoque experimental en el estudio de cáncer de mama toma como base la clasificación molecular, la cual fue propuesta por primera vez por Perou y colaboradores en el año 2000, quienes identificaron una variación en las huellas de expresión génica de 65 muestras quirúrgicas de tumores de mama lo que dio como resultado un retrato molecular distintivo de cada tumor, esto llevo a la identificación de tres subgrupos: luminal, HER-2 positivo, basal (Perou *et al.*, 2000).

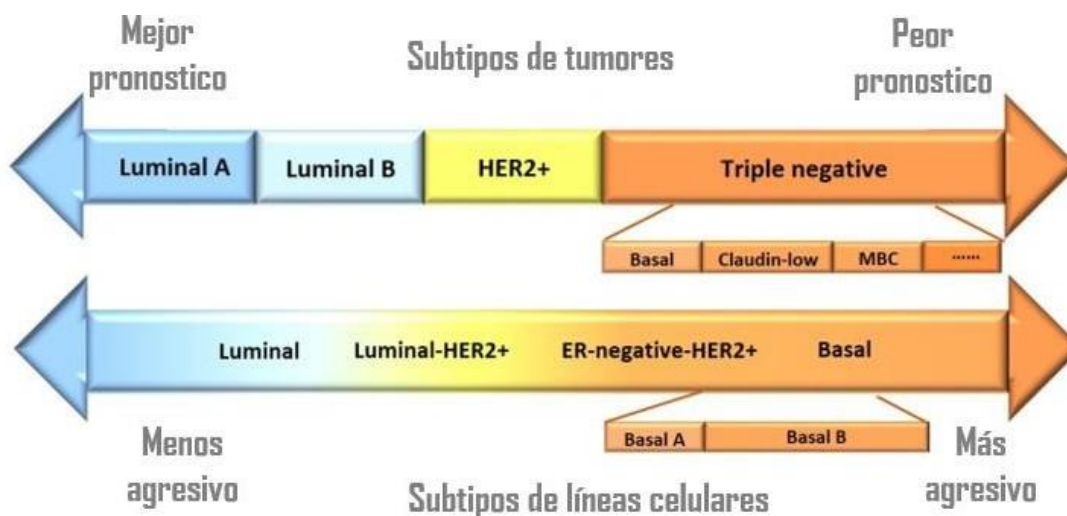
Estos subtipos se encuentran clasificados principalmente por la presencia o ausencia de receptores celulares como son el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), y el receptor dos del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), sin embargo, conforme el uso de las técnicas moleculares ha avanzado, algunas clasificaciones toman en cuenta a otras moléculas como son la claudina, apocrina y marcadores de proliferación como Ki67 (Prat *et al.*, 2010).

La clasificación actual divide al cáncer de mama en cinco subtipos moleculares: luminal A (ER+/PR-), luminal B (ER+/PR+/HER2+), HER2 positivos (ER-/PR/HER2+) y basal o triple negativo (ausencia de receptores). El subtipo luminal (A y B) representan alrededor de un 70% de los casos de cáncer de mama diagnosticado, mientras que el HER2 positivo representa 15% y el basal o triple negativo el cual se ha caracterizado como el subtipo más agresivo y con una pobre respuesta a fármacos solo se presenta en <15% de los casos de cáncer de mama diagnosticados (Eliyatkin *et al.*, 2015; Tsang and Tse, 2020). La clasificación molecular del cáncer de mama ha ayudado a la comprensión del comportamiento de las células tumorales en el ámbito clínico ya que se ha detectado diferencias en la respuesta de los subtipos moleculares al tratamiento, además se ha logrado la detección de un patrón metastásico específico de cada subtipo.

#### **1.5 Cultivos celulares de cáncer de mama**

Las líneas celulares de cáncer de mama han sido, por excelencia, el mejor sistema *in vitro* para la investigación científica debido a que proporcionan una fuente ilimitada de material auto replicante. Actualmente se tienen identificadas 84 líneas celulares establecidas, las cuales se agrupan en cinco grupos, que a su vez abarcan la amplia heterogeneidad celular en cáncer de mama, además son concordantes con los subtipos moleculares descritos anteriormente, sin embargo, a pesar de que el modelo

de los cultivos celulares ha tenido un gran éxito a lo largo de los años puesto que logran capturar las características moleculares principales como la presencia o ausencia del receptor de estrógeno ER y el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En la actualidad prevalece el problema de clasificación de estas líneas celulares, por lo que diversos grupos de investigación clasifican estas líneas celulares en más o menos grupos, lo que complica la comprensión de estas por lo que el número de líneas celulares utilizadas ampliamente en el campo de la investigación es muy limitado. Por ejemplo, uno de los modelos celulares comerciales utilizados en más de dos tercios de investigación científica es la línea MCF7 y T47D para tumores del subtipo luminal, MDA-MB-231 que representa al cáncer de mama triple negativo. Para representar al subtipo luminal B, el cual clínicamente es más agresivo y con peor pronóstico respecto al subtipo luminal A (Figura 4), la línea celular más utilizada es la línea BT-474, la cual se caracteriza por exhibir una morfología epitelial y esta línea fue extraída de un carcinoma ductal de mama sólido e invasivo (Dai *et al.*, 2017; Milczarek, 2020).



**Figura 4. Comparación de los subtipos moleculares de cáncer de mama respecto a su pronóstico clínico.** Tomado y modificado de (Dai *et al.*, 2017).

Una de las técnicas más usada y consolidadas en la investigación del cáncer de mama a nivel mundial es el cultivo celular en dos dimensiones (2D) o también conocido como cultivos en monocapa. En 1907, Harrison y colaboradores implementaron por primera vez estos cultivos, los cuales se caracterizan por formar monocapas simples, es decir,

con una limitada interacción célula a célula debido a que las células están adheridas a una superficie plana, ya sea de plástico o de vidrio o en suspensión por lo que este sistema no puede imitar de manera realista la complejidad del microambiente tumoral celular ni la gran cantidad de interacciones entre los componentes celulares y no celulares, estas interacciones son fundamentales ya que son las que se encargan de regir procesos como la diferenciación, viabilidad, proliferaciones celular, expresión génica y de proteínas entre otros procesos, sin embargo, los cultivos en monocapa han perdurado debido a que se asocian a un mantenimiento relativamente sencillo y a bajo costo (Kapałczyńska et al., 2016; Juarez-Moreno et al., 2022)

En los últimos años, se ha impulsado la implementación de modelos alternativos de cultivos celulares, que emulan más lo que ocurre en microambiente celular tumoral. Un ejemplo de este tipo de sistemas son los cultivos tridimensionales (3D).

## **2. Cultivo celular tridimensional (3D)**

### **2.1 Generalidades de los cultivos 3D**

Los cultivos tridimensionales han ido generando más protagonismo en el campo de investigación del cáncer debido a que poseen una mayor capacidad de representar y recapitular la complejidad que engloba un microambiente tumoral (TME). A diferencia de los cultivos en 2D, los cultivos crecidos en 3D son capaces de simular aún más las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC) mediante el uso de hidrogeles, los cuales poseen componentes exógenos de la matriz extracelular que se encargan de proporcionar la señalización bioquímica y estructural necesaria para la arquitectura celular (Vidi, Bissell and Lelièvre, 2012; Shen *et al.*, 2021).

La MEC es una red de un copilado de macromoléculas de naturaleza proteica donde encontramos a glicoproteínas (fibronectinas, lamininas), proteoglicanos (heparina), proteínas fibrosas (colágeno I y III) las cuales son secretadas por fibroblastos. Su función principal radica en mantener la comunicación y unión celular brindando un soporte mecánico (Saraswathibhatla, Indana and Chaudhuri, 2023). En estos cultivos en 3D las células se agregan espontáneamente y al interactuar con la cadherina logran conformar una estructura esferoide multicelular (Shen *et al.*, 2021) lo que estimula la heterogeneidad celular típica de los tumores, los cuales se caracterizan por presentar un gradiente celular. Las células altamente proliferativas se ubican en la capa exterior

de los esferoides y poseen una captación adecuada de oxígeno y nutrientes. La siguiente capa está constituida por células inactivas, con limitada captación de nutrientes, y en el centro existen células hipóxicas debido a falta de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento lo que se asemeja a los que ocurre en los tumores *in vivo* (Lin and Chang, 2008; Alépée, 2014; Ferreira, Gaspar and Mano, 2018).

En 1977, Hamburger y Salmon fueron de los primeros científicos en establecer este sistema de cultivos tridimensionales, esto con la finalidad de generar un crecimiento en colonias de células madre tumorales en una gran variedad de neoplasias. Llegaron a la conclusión de que las colonias de células madre tumorales que surgen mediante diferentes tipos de cáncer van a presentar una marcada diferencia tanto en el crecimiento como en su morfología celular, lo que dio luz a una investigación más exhaustiva de células tumorales crecidas en 3D (Hamburger and Salmon, 1977).

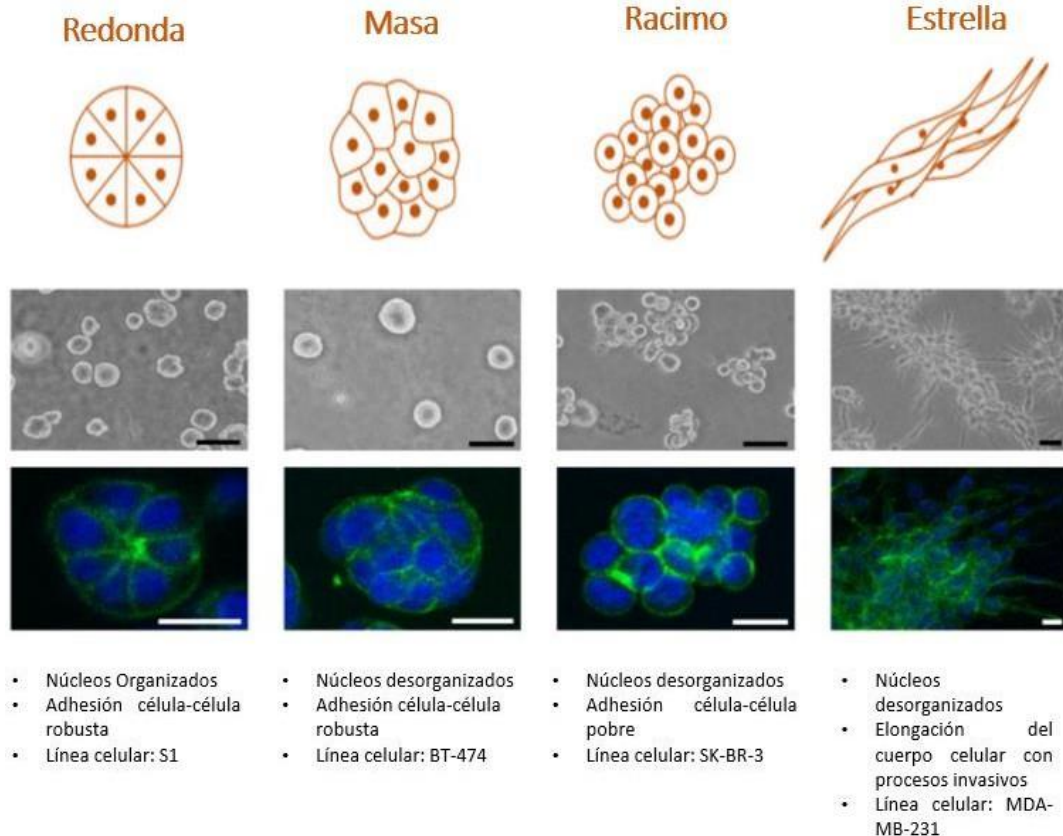
## **2.2 Cultivos celulares de cáncer de mama en 3D**

La mama es un órgano con funciones exocrinas y se encuentra formado por una gran heterogeneidad celular, esto favorece a que las interacciones célula-célula y célula-MEC se restrinjan mecánicamente, como se ha mencionado en el apartado de la glándula mamaria. Sin embargo, la arquitectura celular y la organización nuclear en la glándula mamaria se ve gravemente alterada en la progresión del cáncer, impactando en la diferenciación funcional y la supervivencia celular. Un mecanismo que parece ser especialmente relevante para la progresión del cáncer es la pérdida de la polaridad apical de las células epiteliales luminales. Las membranas basales extracelulares (MB) son estructuras especializadas de la MEC y su importancia radica en la capacidad de anclar a células epiteliales las cuales interactúan con el epitelio y endotelio. Las MB tienen la capacidad de proporcionar señales de orientación a las células epiteliales por lo que ayudan a mantener la polaridad apicobasal (Cox and Ertler, 2011). La polaridad apical se define por las uniones estrechas junto al complejo de adhesión celular apical superior, este permite separar los componentes de la membrana celular y los receptores entre la membrana apical y basolateral (Vidi, Bissell and Lelièvre, 2012) (Vidi. et al. 2013)

Recientemente se ha dado a conocer que las alteraciones en la rigidez de la MEC afectan el comportamiento de las células, por ejemplo, las células epiteliales mamarias

reconstituidas en matrigel tienen la capacidad de formar acinos mamarios polarizados y se diferencian de una manera similar a lo que ocurre *in vivo* (Cox and Eler, 2011). Específicamente en los cultivos celulares de acinos mamarios crecidos en 3D, demostraron que solo las células con polaridad apical alterada se someten al ciclo celular, salida del ciclo celular y supervivencia celular aparentemente por mecanismos epigenéticos (Chandramouly *et al.*, 2007).

Kenny y colaboradores en 2007 lograron identificar diferencias morfológicas en 25 líneas celulares de cáncer de mama crecidos en 3D a diferencias de los cultivos en 2D en donde describieron las morfologías como “no diferenciadas”. Las líneas celulares HCC1500, MCF-12A, MDA-MB-415, MPE-600 y S1 presentaron una formación de colonias redondas mientras que sus núcleos se mostraron organizados al centro de la colonia, por otro lado, las líneas celulares que forman una morfología descrita como “masa” son BT-474, BT-483, HCC70, HCC1569, MCF-7, T4-2 y T-47D las cuales también forman colonias redondas, sin embargo, sus núcleos se encuentran desorganizados. La morfología identificada como “racimo” es representada por las líneas celulares AU565, CAMA-1, MDA-MB-361, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, UACC-812, ZR-75-1 y ZR-75-B, estas forman colonias con una pobre interacción célula-célula; por último, describieron a las líneas celulares que muestran un crecimiento en forma de “estrella”: BT-549, Hs578T, MDA-MB-231 y MDA-MB-436, las cuales muestran un fenotipo invasivo con proyecciones estrelladas que logran unir múltiples colonias celulares (Figura 5) (Kenny *et al.*, 2007).



**Figura 5. Morfología de líneas celulares de cáncer de mama cultivadas en 3D.** Se muestra un esquema representativo y descripciones fundamentales de cada morfología, además de contraste de fase e imágenes de fluorescencia nuclear y de F-actina. Tomada y modificada de (Kenny *et al.*, 2007).

### **2.3 Huellas de expresión génica de cultivos 3D vs 2D en cáncer**

Como se ha mencionado anteriormente, los cultivos en 3D presentan una mayor similitud con los tumores *in vivo* debido al uso de hidrogeles los cuales tienen como componentes a moléculas clave de la MEC. La MEC juega un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer al ser uno de los reguladores más importantes de la función celular y de mantener la homeostasis de los órganos, por lo que la expresión alterada de sus componentes provoca una remodelación dinámica de estos y a su vez genera cambios químicos y físicos en la configuración de esta red proteica que afecta a la proliferación y migración de las células tumorales (Cox and Eler, 2011). Lo anterior ha impulsado y profundizado en la investigación para identificar los cambios en la

expresión génica y los cambios funcionales que se presentan en los cultivos 2D vs. los cultivos embebidos en la MEC (3D).

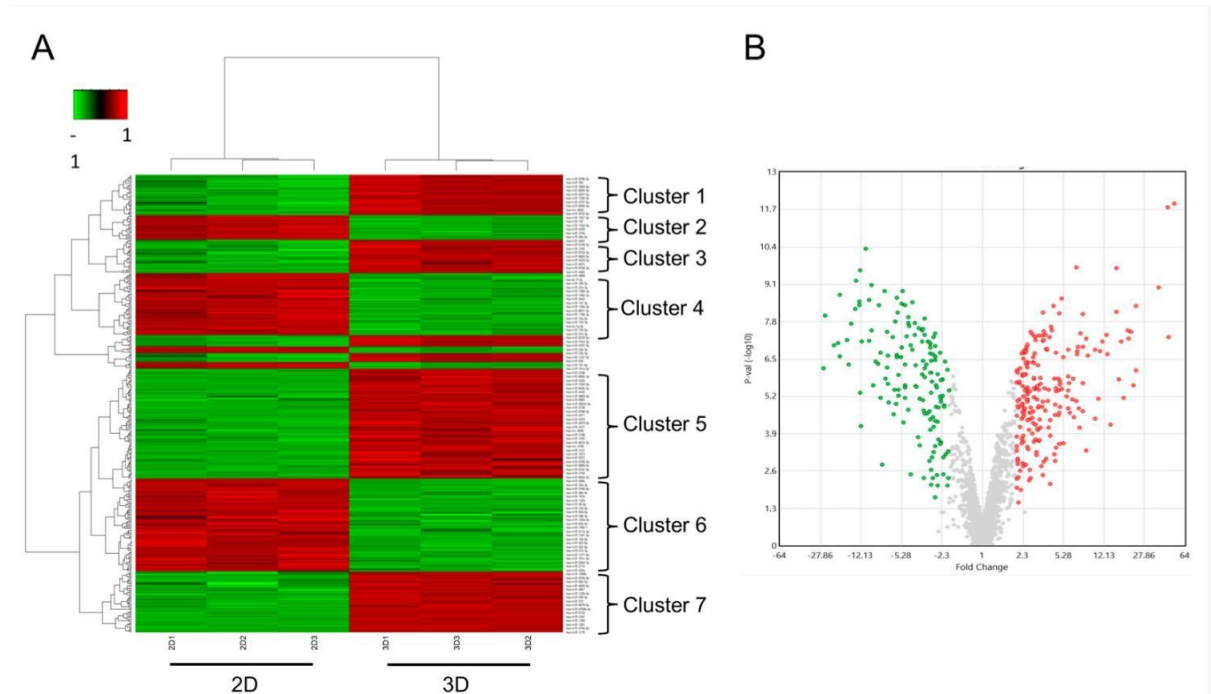
Boghaert y colaboradores (2017) compararon los perfiles transcripcionales de dos líneas celulares de cáncer de pulmón crecidas con tres técnicas, con el fin de identificar las características del cáncer que son activas en los cultivos 2D y 3D en comparación con los tumores xenoinjertados. Sus resultados arrojaron las diferencias en las huellas de expresión génica debido a que los cultivos 3D mostraron un patrón de expresión muy similar a el perfil de expresión de los tumores xenoinjertados, es decir, se observaron alteraciones en la activación de procesos celulares comunes en la tumorigénesis, como la hipoxia, la proliferación, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la adhesión celular, y la activación de interleucinas lo cual no ocurrió en la misma intensidad con los cultivos crecidos en monocapa (Boghaert *et al.*, 2017).

Asimismo, se ha demostrado que, en las células tumorales, la remodelación que sufre la MEC provoca una rigidez gradual de los tumores, específicamente, en el tejido mamario sano, la rigidez de la matriz extracelular puede ejercer fuerzas mecánicas de hasta 400 Pascales (Pa), sin embargo, en las células tumorales se estima una fuerza que varía de 1050 a 5000 Pa, este cambio en las fuerzas de compresión da como resultado la alteración de la expresión genómica diferencial (Lopez *et al.*, 2011). La rigidez de la MEC también se involucra en el cambio de expresión de moléculas reguladoras a nivel postranscripcional de la expresión génica como son los microRNAs (miRNAs) (Mouw *et al.*, 2014)

A pesar de que los miRNAs se habían considerado como “basura” genómica, han cobrado relevancia debido a que se ha reportado que el perfil de expresión de estos, se ve desregulado en diversos tipos de cáncer en comparación con el tejido normal y en muchos de estos, el cambio en su expresión es una clara firma de la progresión y metástasis del cáncer (Hussen *et al.*, 2021).

En las líneas celulares de cáncer de mama del subtipo basal (Hs578T) y luminal A (T47D) crecidas en 2D y 3D se ha analizado el perfil de expresión de miRNAs y se encontraron que 354 miRNA se expresaron de manera diferencial en cultivos 3D en relación con cultivos 2D en células Hs578T (Figura 6), mediante herramientas bioinformáticas se ha predicho que los miRNA regulados a la baja pueden contribuir a

una regulación positiva de los genes involucrados en la hipoxia, los procesos catabólicos y la adhesión focal, mientras que los miRNAs sobre expresados pueden modular genes involucrados en la regulación negativa del ciclo celular (Salinas-Vera *et al.*, 2022).



**Figura 6. Perfil de expresión de miRNAs cultivados en condiciones 2D y 3D de células de cáncer de mama Hs578T.** ( A ) Mapa de calor de miRNA en cultivos 2D y 3D. Cada columna representa una muestra individual y cada fila representa un miRNA diferente. El rojo representa niveles altos de expresión, mientras que el verde representa niveles bajos de expresión. ( B ) Gráfico de diagrama de volcán, el color rojo indica que la expresión de miRNAs aumentó más de 2 veces, mientras que el color verde indica que la expresión de miRNAs disminuyó más de 2 veces en cultivos organotípicos 3D, en comparación con el grupo de control 2D (Salinas-Vera *et al.*, 2022)

### 3. RNAS LARGOS NO CODIFICANTES

#### 3.1 Definición, biogénesis y clasificación

Los RNA largos no codificantes (lncRNAs) son moléculas que carecen de secuencias codificantes canónicas, a diferencia de los mRNAs. Los lncRNAs se encuentran poco

conservados entre diferentes grupos de especies por lo que se ha debatido ampliamente la importancia de estas moléculas, sin embargo, en las últimas décadas se les han atribuido diversas funciones biológicas que han despertado interés en el ámbito científico y clínico debido a su participación en diversas enfermedades cardiovasculares (Le and Nhu, 2023), enfermedades oftalmológicas (Zhou, Li and Yoshida, 2022), en la progresión del cáncer, entre otras (Chi *et al.*, 2019).

Los lncRNAs se definen como transcritos de RNA mayores a 200 nucleótidos, transcritos por la RNA polimerasa II, no obstante, estos transcritos no codifican para proteínas, por lo que su funcionalidad parece ser que depende de la expresión, la secuencia y la estructura del lncRNA, sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos de ellos poseen marcos de lectura abierta pequeños (smORF) por lo que tienen la capacidad de transcribir micropéptidos funcionales (Patraquim *et al.*, 2022).

La biogénesis de los lncRNAs es comparable con la de los RNAm, es decir, su activación transcripcional es de forma similar, comenzando por la RNA polimerasa II y la RNA pol III en varios *loci* del genoma (Dahariya *et al.*, 2019), posteriormente sufren de la adición de metilcitosina en la cadena 5' (capping) y de una cola de poli (A) en 3' (poliadenilación). Solo el 25% de los lncRNAs experimentan empalme alternativo, (Sparber *et al.*, 2019), sin embargo, se han identificado otros mecanismos canónicos por los cuales pueden ser procesados como es la escisión mediante las ribonucleasas P (RNAsa P), este mecanismo se encarga de producir extremos 3' maduros a su vez se encarga de la protección por complejos snoRNA-proteína en sus extremos, otro proceso que regulan la biogénesis de los lncRNAs son las modificaciones epigénéticas las cuales dependen de su origen genómico (Liu *et al.*, 2021)

El método más simple de clasificación de lncRNA se relaciona con su tamaño: lncRNA pequeño (200-950 nt), lncRNA mediano (950-4800 nt) y lncRNA grande (> 4800 nt) (Zhao *et al.*, 2013). A pesar de que existen diversas clasificaciones que intentan agrupar la amplia diversidad de los lncRNAs la clasificación más utilizada es la que depende de su origen o localización genómica, esta clasificación alberga cinco clases de lncRNAs; sentido, anti-sentido, bidireccional, intrónico e intergénicos.

1. lncRNAs sentido: Transcripción a partir de la cadena con sentido de los genes codificadores de proteínas, este tipo de lncRNAs pueden superponerse con fragmentos de los genes codificadores.
2. lncRNAs anti-sentido: Se transcriben a partir de la cadena anti sentido de genes codificadores de proteínas.
3. lncRNAs bidireccional. Se transcriben cerca del promotor a menos de 1kb del gen codificador de proteínas asociado y se transcribe en la dirección opuesta.
4. lncRNAs intrónicos: Transcrito completamente a partir de intrones generalmente largos de genes codificadores de proteínas.
5. lncRNAs Intergénicos: Aquellos que se transcriben desde regiones intergénicas en ambas cadenas, estos lncRNAs también son conocidos como lincRNA son los más conservados en comparación con los intrónicos y anti-sentido.
6. Los lincRNAs funcionan a través de diversos mecanismos como es la regulación transcripcional cis o trans, control traduccional, regulación del splicing entre otras (Ma, Bajic and Zhang, 2013; Liu *et al.*, 2021).

### **3.2 lncRNA como reguladores maestros de la expresión génica en múltiples niveles**

Anteriormente los lncRNAs se consideraban “basura o ruido genómico”, sin embargo, según el proyecto FANTOM5 en el genoma humano se ha estimado alrededor de 28 000 genes que transcriben a los lncRNAs, esta cifra es comparable con la cantidad de genes que tienen el potencial de codificar para proteínas (Hon *et al.*, 2017) esta cifra fue el primer indicio de que estas moléculas podrían estar jugando un papel muy importante en la regulación de la expresión génica. El rápido desarrollo de nuevas tecnologías ayudó a los investigadores a desmenuzar el papel que juegan los lncRNAs.

La mayoría de los lncRNAs que han sido estudiados se clasifican en cinco grupos dependiendo la función y mecanismos moleculares que regula:

1. lncRNAs señal: Estos lncRNAs actúan como señales moleculares en respuesta a diversos estímulos por lo que regulan la expresión génica en el espacio y el

tiempo uniéndose directamente al DNA o combinándose con algún receptor hormonal (HR) o con algún factor de transcripción (TF).

2. lncRNAs señuelo (decoy): Estos lncRNAs funcionan como señuelos proteicos para miRNAs o TF evitando que estos se unan a sus blancos y ejerzan su función reguladora impidiendo su acceso al DNA.
3. lncRNAs andamio (scaffold): Actúan como andamio para formar complejos de ribonucleoproteínas con diferentes proteínas asociadas, lo que regula la transcripción de sus genes blanco.
4. lncRNAs guía: Modulan la expresión génica guiando el complejo de ribonucleoproteína a sus genes blanco.
5. lncRNAs sineups: Son lncRNA antisentido naturales o sintéticos que activan la traducción de sus RNAm blanco reclutando a PTBP1 y HNRNPK para formar complejos de iniciación de la traducción (Mercer, Dinger and Mattick, 2009; Liu *et al.*, 2021).

### **3.2.2 Mecanismos de acción de los lncRNAs**

Los mecanismos de acción que ejercen los lncRNAs dependen en gran medida de la distancia del sitio de dónde se transcriben, algunos lncRNAs pueden regular a genes a una distancia de hasta 10 kb. Sin embargo, su mecanismo de acción también depende de su localización en la célula; los lncRNAs nucleares llevan a cabo funciones relacionadas con modificación a nivel de la cromatina y una regulación a nivel transcripcional, por otro lado, están los lncRNAs citoplásmicos, estos suelen regular la expresión a nivel post-transcripcional a través de miRNAs o estar implicados en la regulación de las cascadas de señalización celular (Batista and Chang, 2013). Muchos lncRNAs también pueden procesarse en RNAs cortos como los siRNAs y pueden provocar una baja expresión génica al degradar las transcripciones de su RNAm blanco. En este sentido se han encontrado lncRNAs que pueden “secuestrar” o “esponjear” a miRNAs mono o bicatenarios que actúan como RNAi (RNA interferente) y se dirigen a otros RNAm, lo que posteriormente podría resultar en la degradación de su blanco. Esta red de correulación también se conoce como ceRNA (competing endogenous RNA) (Karlsson and Baccarelli, 2016), por ejemplo, *linc-MD1* (asociado con la diferenciación muscular), actúa como una esponja de miR-133 y miR-135 para

regular la expresión de dos factores de transcripción: *MAML1* (mastermind-like protein 1) y *MEF2C*, que activan la expresión de genes específicos del músculo (Ma, Bajic and Zhang, 2013)

Wang, J y colaboradores estudiaron al lncRNA HULUC en cáncer de hígado y reportaron que se encuentra sobreexpresado en esta neoplasia y este tiene la capacidad de secuestrar e inhibir la función de diversos miRNAs incluido el miRNA-372 el cual es considerado como un supresor tumoral, por lo que su inhibición conduce a la reducción de la represión traduccional de su gen blanco *PRKACB* que, a su vez, induce la fosforilación de CREB lo que da lugar a un cambio en la función de las histonas y ocurren procesos como la desacetilación y la metilación de estas (Wang *et al.*, 2010)

### **3.3 Los lncRNAs desregulados en los procesos celulares del cáncer**

Múltiples evidencias generadas por diversos grupos de investigación sugieren que una desregulación o mutación en los genes que transcriben los lncRNAs constituyen un componente crucial en la progresión tumoral mediante su participación en mecanismos reguladores del estrés oxidativo, la inflamación, la apoptosis, el crecimiento y viabilidad celular; por lo que estas moléculas pueden servir como biomarcadores (Tabla 1)(Khalil *et al.*, 2009; Zhang, Guan and Tang, 2021).

El lncRNA H19 ha sido el más estudiado en cáncer por lo que se tiene la certeza que este lncRNA se encuentra sobre expresado en numerosos tumores sólidos en donde se incluye el cáncer hepatocelular y de vejiga. El mecanismo de acción del lncRNA H19 es importante en la tumorigénesis debido a sus cualidades oncogénicas y supresoras de tumores (dependiendo el tipo de cancer), la supresión de la expresión *del H19* altera el crecimiento celular y la clonogenicidad en líneas celulares de cáncer de pulmón *in vitro* y disminuye el crecimiento tumoral de xenoinjerto de las células de carcinoma hepatocelular Hep3B (Matouk *et al.*, 2007).

Recientemente un grupo de investigadores realizó un estudio a nivel nacional en el cual analizaron el panorama transcripcional de lncRNA en 74 tumores de mama pertenecientes a los cuatro subtipos moleculares, identificaron 307 lncRNAs (27 sobre

expresados y 280 subexpresados). Interesantemente, el análisis de agrupamiento jerárquico de estos lncRNA fue capaz de discriminar de manera óptima los tejidos tumorales mamarios de las muestras de tejidos normales. A través del análisis de co-expresión entre lncRNAs y genes codificantes de proteínas y mediante el análisis de enriquecimiento genético, determinaron la función potencial de los lncRNAs más desregulados en cada subtipo molecular, concluyendo en una amplia gama de funciones biológicas de los lncRNAs (Cedro-Tanda et al., 2020).

Particularmente, en cáncer de mama el rol de los lncRNAs se ha asociado a procesos como la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la metástasis, por ejemplo, el lncRNA inducido negativamente por el receptor de andrógenos (ARNILA) promueve la EMT, la invasión y la metástasis tanto *in vitro* como *in vivo*. ARNILA se ha correlacionado con una supervivencia libre de progresión en pacientes con TNBC (cáncer de mama triple negativo) a su vez, ARNILA actúa como un ceRNA para miR-204, por otro lado, la regulación positiva de ARNILA mejora la expresión de la proteína SOX4, que regula negativamente la expresión de E-cadherina pero regula positivamente la expresión de N-cadherina y, por lo tanto, promueve la metástasis del TNBC (Yang et al., 2018; Mondal and Meeran, 2020).

**Tabla 1. lncRNAs identificados en cáncer de mama.** Tomado y modificado de (Zhang, Guan and Tang, 2021)

<b>lncRNAs</b>	<b>EXPRESIÓN</b>	<b>FUNCIÓN BIOLÓGICA</b>	<b>BLANCO</b>
GAS5	DOWN	Inhibe la proliferación y la invasión celular; promueve la apoptosis celular; inhibe la resistencia a paclitaxel, cisplatino, adriamicina e inhibidores de PI3K/mTOR	miR-378a-5p/SUFU, miR-196a-5p
LINC02095	up	Promover la proliferación celular	SOX9
HOTAIR	UP	Promueve la migración e invasión celular; resistencia a imatinib y lapatinib	miR-148a; LEF1/TCF4
WT1-AS	DOWN	Inhibir la migración y la invasión celular.	TGF-β1

LINC00096	UP	Promover la proliferación y la invasión celular.	miR-383-5p/RBM3
DRHC	DOWN	Inhibir la proliferación celular	HOTAIR
HEIH	UP	Promover la proliferación celular, Inhibir la apoptosis celular	miR-4458/SOCS1
LUCAT1	UP	Promover la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la metástasis; inhibir la apoptosis celular	miR-5702
CCAT1	UP	Promover la proliferación, migración e invasión celular.	miR-218/ZFX
ASRPS	DOWN	Inhibir la angiogénesis	STAT3
HAND2-AS1	DOWN	Inhibir la proliferación celular	RUNX2
LINC01133	UP	Promover rasgos fenotípicos similares a los de las células madre celulares (CSC)	KLF4
PAPAS	UP	Promover la migración y la invasión celular.	miR-34a
HCP5	UP	Promover la proliferación celular; Inhibir la apoptosis celular	miR-219a-5p/BIRC3
NRADD1	UP	Promueve la proliferación celular y rasgos fenotípicos similares a los de las CSC	-

### 3.4 Funciones del RNA largo no codificante LINC01087 en cáncer de mama

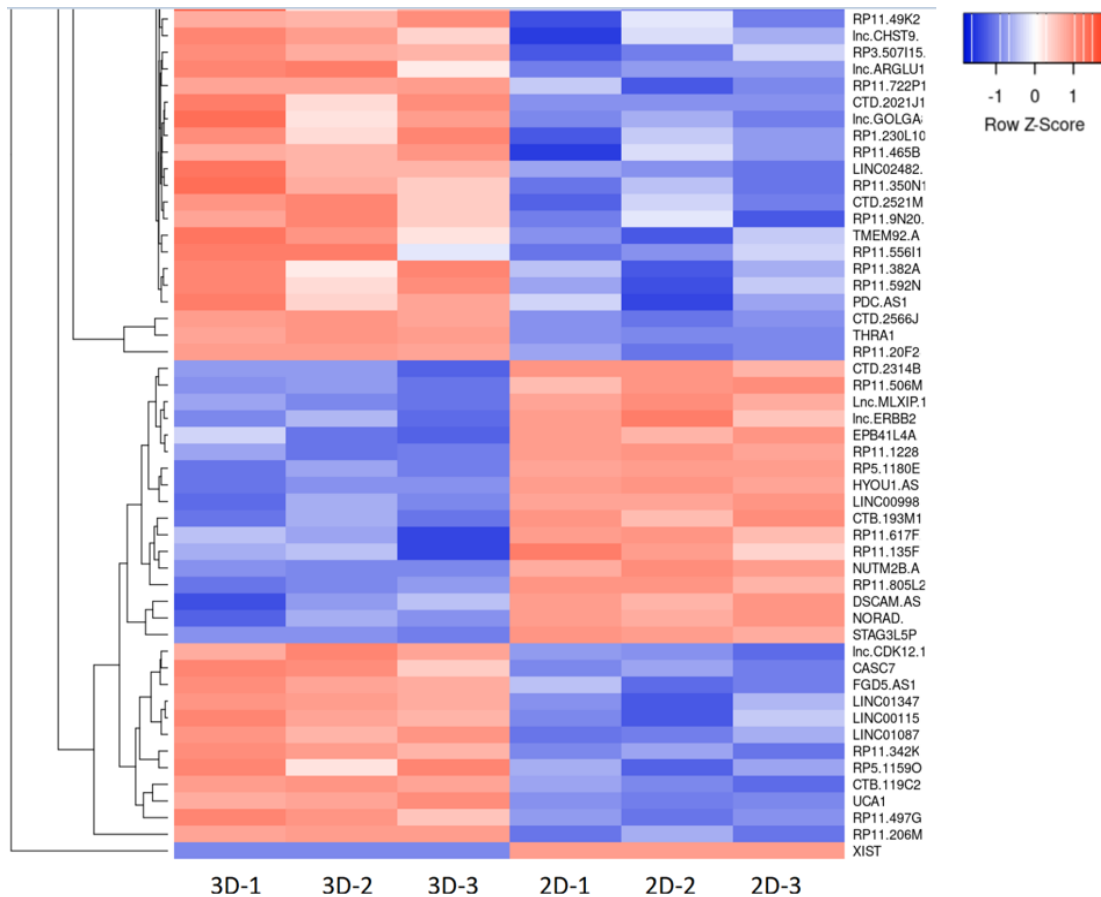
EL RNA largo no codificante intergénico 01087 (LINC01087) es un lncRNA descrito recientemente que cuenta con una longitud de 3516 nt y se encuentra en el cromosoma 2, sin embargo su función ha sido poco estudiada (De Palma *et al.*, 2022). Un estudio reciente demostró una expresión variable de LINC01087 en los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, esta variación coincidió con la expresión modulada de factores que regulan la supervivencia, la proliferación, la adhesión, la invasión y la inflamación celular así como la sensibilidad a fármacos (De Palma *et al.*, 2020). Por

otro lado, She y colaboradores en 2020 reportaron que el LINC01087 estaba involucrado en el desarrollo maligno del cáncer de mama. Ensayos de RT-qPCR revelaron que la expresión de LINC01087 en los tejidos con cáncer de mama era mayor que la de los tejidos adyacentes al tumor, y el análisis de supervivencia reveló un pronóstico desfavorable de los pacientes con alta expresión de LINC01087. Posteriormente, hicieron un silenciamiento del LINC01087 y descubrieron que se inhibía la proliferación, la invasión y la migración de células de cáncer de mama y, además promueve la apoptosis a través del miR 335-5p y del mRNA de *ROCK1* (She *et al.*, 2020).

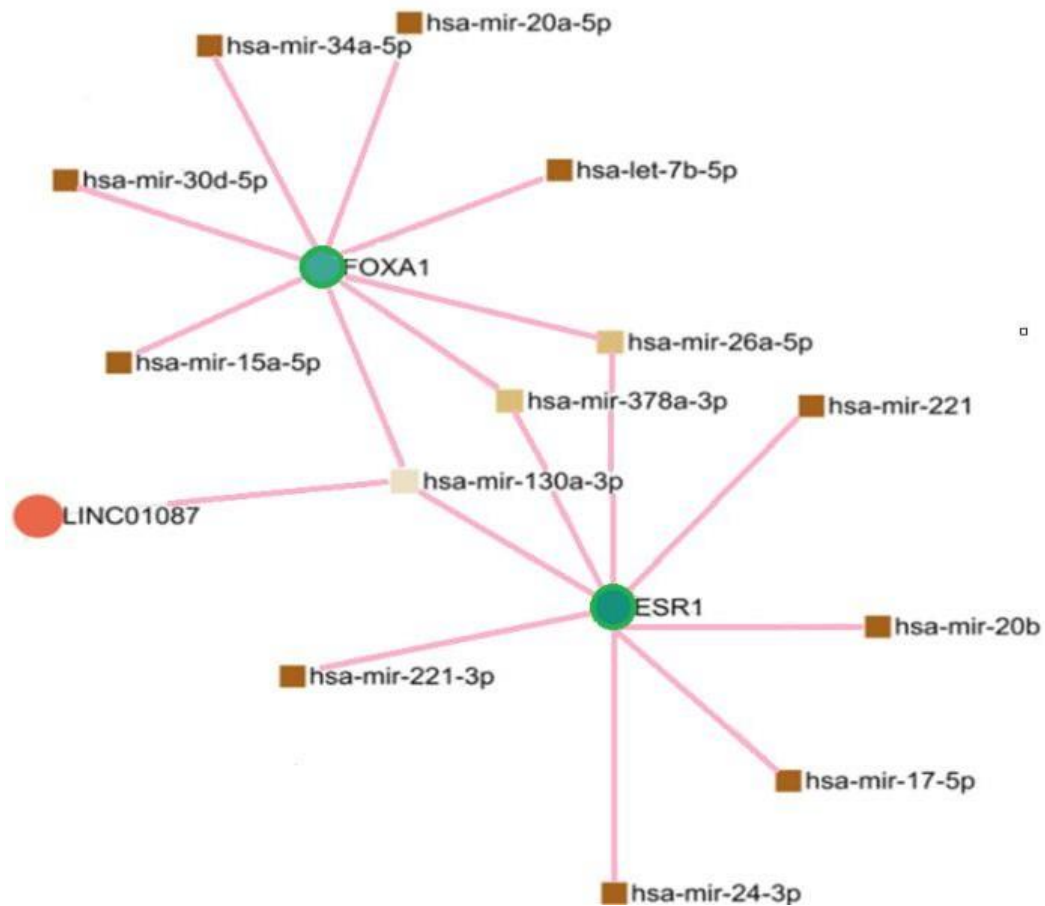
Tripathi y colaboradores en 2019 identificaron un conjunto de cuatro lncRNAs que interactúan con miRNAs o proteínas que estaban desreguladas en el cáncer de mama utilizando la técnica de secuenciación de RNA en diferentes muestras, estos actúan como impulsores oncogénicos que contribuyen al fenotipo canceroso. LINC01087 se mostró sobre expresado en células *in vitro* y redujo tanto la viabilidad celular como la apoptosis. Posteriormente, hicieron predicciones bioinformáticas y descubrieron una red co- reguladora entre LINC01087-hsa-miR-548 y serina/treonina quinasa 1 (AKT1) (Tripathi *et al.*, 2020).

Recientemente nuestro grupo de investigación estudió la expresión y las funciones potenciales de los lncRNAs en células de cáncer de mama BT-474 luminal B positivo para el receptor de estrógenos cultivadas en 3D. Para estudiar el perfil de expresión global utilizaron microarreglos de DNA los cuales identificaron 290 lncRNAs regulados positivamente y 183 lncRNAs regulados negativamente en los cultivos 3D en relación con la condición 2D (Figura 7). Posteriormente, haciendo uso de un enfoque de análisis de coexpresión de pares de lncRNAs y mRNAs identificaron cientos de ejes reguladores que modulan genes involucrados en características distintivas del cáncer, como respuestas a estrógenos, la proliferación celular, la hipoxia, a las uniones apicales y la resistencia a la terapia endocrina. También se logró la identificación de 102 correlaciones entre lncRNAs/mRNA en cultivos 3D, que fueron similares a las reportadas en conjuntos de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas* por las siglas en inglés) obtenidos de pacientes con cáncer de mama luminal B. Interesantemente, en el heatmap obtenido mediante los microarreglos de lncRNAs se observa una sobreexpresión del LINC01087 en los cultivos 3D con un valor de fold change (FC) de

9.16 respecto a los cultivos en 2D (Figura 7), posteriormente mediante herramientas bioinformáticas se predijo una red de correlación LINC01087/miR-130a-3p/FOXA1 (Figura 8) (Nuñez-Olvera et al., 2022).



**Figura 7. Perfil de expresión de RNAs largos no codificantes en células de cáncer de mama BT-474.** Mapa de calor que muestra la agrupación jerárquica de lncRNA modulados por ligamiento promedio basado en mediciones de distancia euclidiana. El rojo representa la regulación negativa y el verde representa la regulación positiva. (Nuñez-Olvera *et al.*, 2022)



**Figure 8. Red de correulación LINC01087/hsa-miR-130a-3p/FOXA1. A.** Interacciones entre miRNAs- mRNA y LINC01087 obtenidas a través de miRNET y graficado por Cytoscape v3.7.0. (Nuñez-Olvera *et al.*, 2022).

### 3.3.1 Función del miR.130a-3p en cáncer de mama

Los micro RNAs (miRNAs), son RNAs pequeños, sin embargo, estos no poseen la capacidad de codificar para proteínas, actualmente estas moléculas se consideran como moduladores clave a nivel transcripcional y postranscripcional uniéndose a su RNAm blanco y dependiendo del nivel de complementariedad con el miRNA puede influir en la síntesis de proteínas (Bouz Mkabaah *et al.*, 2023). El miR-130<sup>a</sup>-30 es un miRNA que proviene de la cadena en sentido 5´-3´(forward) y se encuentra en la posición genómica 11q12.1.

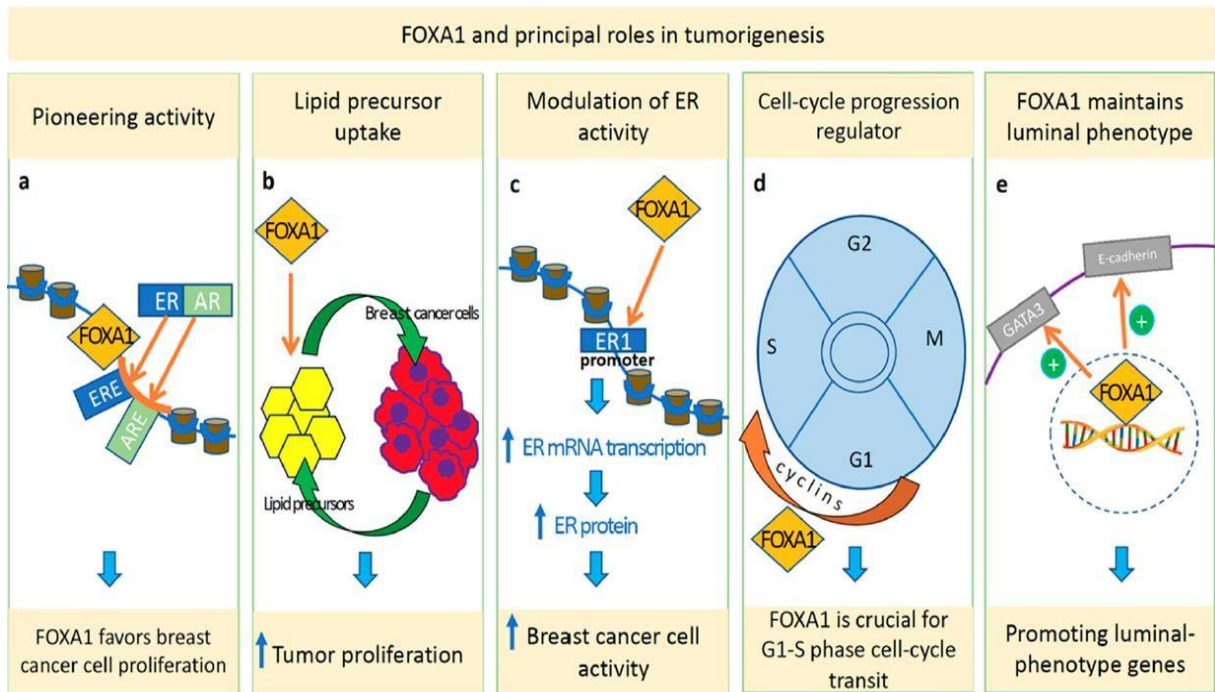
Poodineh y colaboradores en 2020 proporcionaron evidencia sobre el papel de miR-130a- 3p en la regulación de la cascada Wnt/ $\beta$ -catenina, y también introdujeron el miR-130a-3p como un nuevo objetivo terapéutico para los pacientes TNBC, esto como resultado de ensayos de qRT-PCR los cuales mostraron una regulación negativa de

miR-130a-3p y una regulación positiva de los genes de la cascada Wnt en las células tumorales en comparación con las células normales. La sobreexpresión de miR-130a-3p, redujo la proliferación, el crecimiento independiente, así como la migración de las células de cáncer de mama triple negativo (Poodineh *et al.*, 2020). Kong en 2018 demostró que el miR-130a-3p está regulado a la baja en los tejidos de cáncer de mama humano y los exosomas de la sangre circulante. La sobreexpresión de miR-130a-3p en células de cáncer de mama inhibió la proliferación, migración e invasión celular, y el silenciamiento de miR-130a-3p tuvo los efectos opuestos. A su vez probaron que la proteína RAB5B está directamente regulado por miR-130a-3p. La eliminación de RAB5B también inhibió la proliferación, migración e invasión celular (Kong *et al.*, 2018)

### **3.3.2 FOXA1 en la progresión tumoral en cáncer de mama**

FOXA1 se conoce como un factor pionero debido a su capacidad de unirse a heterocromatina altamente compacta y posteriormente exponer el DNA a otros factores de transcripción. Específicamente, FOXA1 es esencial para la unión de los receptores de estrógeno (ER) y de andrógenos (AR) a la cromatina y la subsiguiente inducción transcripcional de genes luminales en células de cáncer de mama. La expresión de FOXA1 a nivel de mRNA es directamente proporcional a los niveles de ER y AR. FOXA1 ha sido etiquetado como un “gen luminal”, promoviendo características moleculares, morfológicas y clínicas de los tumores luminales (Su *et al.*, 2021)

Los principales mecanismos que tiene FOXA1 en la tumorigénesis son: la actividad pionera antes mencionada, mediante la captación de precursores lipídicos, regulación de la progresión del ciclo celular y la modulación de la actividad del receptor de estrógenos (Figura 9) (Metovic *et al.*, 2022)



**Figura 9. Funciones principales de la proteína FOXA1 en cáncer de mama.** (A) actividad pionera, (B) captación de precursores lipídicos, (C) modulación de la actividad del receptor de estrógeno (ER), (D) regulación de la progresión del ciclo celular, (E) mantenimiento de la expresión de genes específicos del lumen. Tomada y modificada de (Metovic *et al.*, 2022).

## **II. Hipótesis**

El LINC01087 se sobreexpresa en los cultivos 3D en células BT-474 por lo que su inhibición resultará en una sobre expresión del miR-130a-3p provocando la disminución del mRNA que codifica para la proteína FOXA1 y la inhibición de la proliferación, la migración y el mimetismo vasculogénico en células de cáncer de mama luminal B.

### **III. Justificación**

El cáncer de mama es uno de los tres tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia en el mundo y en México es la principal causa de muerte en las mujeres. Los estudios genómicos en cáncer de mama han identificado diversas moléculas reguladoras de procesos que favorecen la progresión del cáncer. Una de estas moléculas son los lncRNAs, los cuales en su mayoría han sido poco estudiados en tejidos y en cultivos celulares. Particularmente, el LINC01087 ha sido poco estudiado en cáncer de mama. En estudios previos, hemos reportado que LINC01087 se sobreexpresa en cultivos 3D de la línea celular BT-474 de cáncer de mama luminal B. Sin embargo, se desconoce el papel funcional y biológico a través del eje LINC01087/miR-130a-3p/ FOXA1. Por lo tanto, en este trabajo aportará un posible biomarcador que contribuirá al tratamiento del cáncer de mama luminal B.

## IV. Objetivos

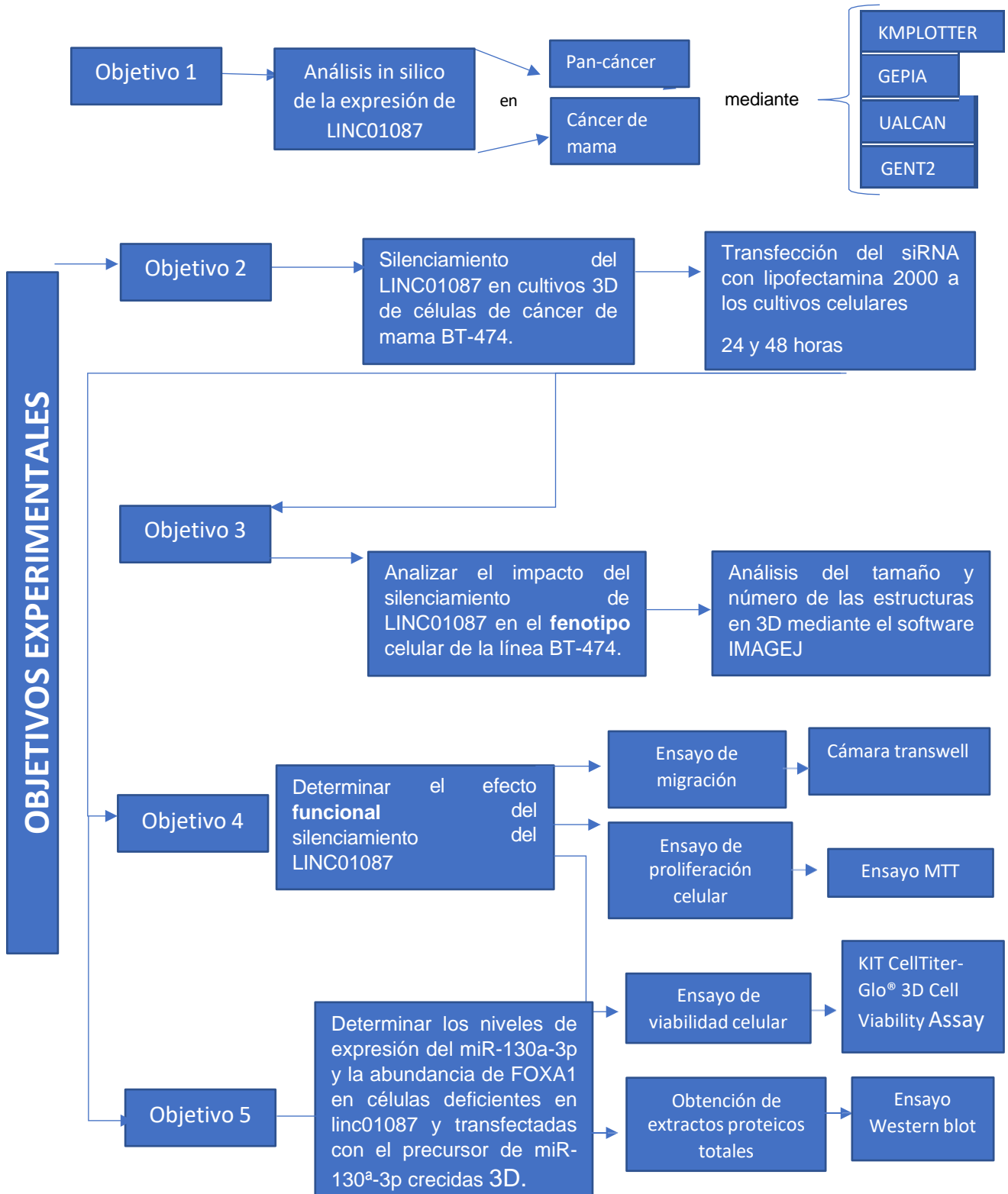
### 4.1 Objetivo general

Analizar la función del eje LINC01087/miR-130a-3p/FOXA1 en la proliferación, migración y mimetismo vasculogénico celular en cultivos en 3D de cáncer de mama.

### Objetivos particulares

1. Analizar la expresión *in silico de* LINC01087 en pancancer y en los subtipos moleculares de cáncer de mama.
2. Disminuir la expresión de LINC01087 a través del uso de siRNA en cultivos 3D de células BT-474de cáncer de mama luminal B.
3. Analizar el impacto del silenciamiento del LINC01087 en el tamaño y número de las estructuras celulares en 3D.
4. Determinar el efecto del silenciamiento del LINC01087 en la viabilidad, proliferación, migración y mimetismo vasculogénico de las células en 3D de cáncer de mama.
5. Determinar la abundancia de FOXA1 en células si-LINC01087 y en células transfectadas con el precursor de miR-130a-3p crecidas en 3D.

## V. Estrategia experimental



## **VI. Materiales y métodos**

### **6.1 Cultivos celulares en 2D.**

La línea celular de adenocarcinoma de mama del subtipo luminal B BT-474 se obtuvieron mediante la compañía ATCC (Manassas, Virginia) y posteriormente se cultivaron en medio Hybri-Care suplementado con penicilina- estreptomicina y con suero fetal bovino (SFB) al 10% a 37°C en una incubadora humificada con una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para la generación de los cultivos en 2D, las células se cultivaron en cajas de cultivo convencionales.

#### **6.1.2 Generación de cultivos celulares en 3D**

Para la generación de los cultivos 3D, un día antes, se descongeló a 4 °C el geltrex libre de LDEV y reducido en factores de crecimiento (Thermo Fisher Scientific), al siguiente día se añadieron 120 µL de Geltrex a placas de 24 pocillos evitando la formación de burbujas, se incubaron a 37 °C durante 30 min para permitir la solidificación. Posteriormente, se añadieron  $3.1 \times 10^4$  células del cultivo 2D de BT-474 con 250 µL de medio Hybri-Care y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se agregó arón 250 µL de medio Hybri-Care suplementado con 5% de geltrex, y al día siguiente y cada tres días a partir de entonces, los cultivos recibieron 500 µL de medio completo fresco.

### **6.2 Transfección del siRNA lncRNA-SNHG7 en cultivos en 2D**

Una vez establecido el cultivo celular de la línea BT-474 se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos, se dejaron en incubación a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> toda la noche para permitir que el cultivo se adhiera y tome la morfología típica de la línea celular. Al día siguiente se transfectó el siRNA específico de LINC01087 (si-LINC01087) a una concentración de [60nM] por 24 horas. Los complejos con el siRNA se formaron utilizando Lipofectamine 2000 en medio de crecimiento Hybri-care sin suplementar con SFB.

#### **6.2.2 Transfección del siRNA lncRNA-SNHG7 en cultivos en 3D**

En el día 4 del establecimiento del cultivo 3D, los esferoides tumorales se transfectaron con si-LINC01087 [60nM] por 48 horas. Se siguió el protocolo descrito por Morgan y

colaboradores, con algunas modificaciones (Morgan R *et al.*, 2018). Concisamente, los complejos de siRNA se formaron utilizando Lipofectamine 2000 en Hybri-care que contenía 10 % de SFB (Gibco).

### 6.3 Extracción del RNA total de los cultivos en 3D y 2D de la línea celular BT-474

El RNA total, se aisló a partir de células en monocapa y esferoides BT-474 a las 24 y 48 horas (respectivamente) después de la transfección del si-LINC01087. Para los cultivos 3D, se agregó 1 ml de TripLE express 1X (Thermo Fisher Scientific) durante 10 min con el fin de despegar los cultivos 3D de la matrigel, una vez despegados los esferoides se transpasaron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugo a 1200 rpm. Se agregó 500uL de trizol a las células BT-474 cultivadas en sistemas 2D y 3D y se mezcló por pipeteo, se recuperó el lisado celular en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se incubo durante 5 min a T.A, se agregó 100 µL de cloroformo y se mezcló vigorosa durante 15 seg, se incubo el tubo eppendorf durante 3 min a T.A y se centrifugo a 12,500 r.p.m por 25 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, se recuperó la fase acuosa cuidando de no mezclar las otras fases, y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL, se adicióno 200 µL de isopropanol para precipitar el ARN y se incubo en hielo durante 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugo a 12,500 r.p.m durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lava con 1mL de etanol al 75 % y se dejó secando durante 5 min. Posteriormente, se re-suspendio en 30 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente, el RNA obtenido se cuantifico por espectrofotometría con el equipo nanodrop 2000 y visualizado mediante geles de agarosa/TAE al 1% para comprobar su integridad.

### 3.5 Tratamiento con DNAsa

Una vez obtenido el RNA total de los cultivos en 3D de las células BT-474 de cáncer de mama se sometió al tratamiento con DNAsa para asegurar la degradación del DNA genómico. Se utilizo la DNAsa RQ1 Promega ajustando las cantidades según la hoja técnica para 1 ug del RNA extraído y llevando a un volumen final de 10 uL Posteriormente el mix se incubo a 37°C durante 2 h y se le añadió 1 uL de la solución de paro para la inactivación de la enzima. Se incubo 10 minutos a 65°C y se almacenará a -20°C hasta su manipulación.

## 6.5 qRT-PCR en tiempo real

Para confirmar la transfección de siRNA LINC01087 en los cultivos en 2D y 3D, se realizó la qRT-PCR. El RNA total de las células transfectadas con si-LINC01087, las células transfectadas con si-scramble (control negativo) y las células control cultivadas en 3D se extrajo utilizando el reactivo TRizol (Invitrogen, EE.UU.). La qRT-PCR se realizó usando el kit SuperScript™ III Platinum™ SYBR™ Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen™) el cual contiene un mix de enzimas (transcriptasa inversa y la DNA polimerasa). Los cebadores utilizados en este estudio se enlistan en la tabla 1. El gen *GAPDH* se seleccionaron como control interno. La cuantificación relativa se determinó por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Tabla 2. Secuencia de los cebadores diseñados para amplificar LINC01087**

Gen	Secuencia de cebadores
LINC01087	F 5' GGGGCATGATGATGAGAGAA 3'
	R 5' TGCAAAAGTTCTGTGGCAAA 3'

## 6.6 Ensayo de viabilidad celular en los cultivos 2D y 3D transfectados con si-LINC01087

Una vez transcurrido el tiempo de transfección en los cultivos 2D y 3D en los tiempos y metodología descrito anteriormente. Para el cultivo en 2D se utilizaron placas de 96 pocillos y se cultivaron  $3 \times 10^4$  células, posteriormente se añadió el reactivo MTT 5 mg/mL en una dilución 1/10, se incubó por 4 h y se agregó una solución solubilizadora por 15 min a temperatura ambiente, por último, se leyó por espectrometría a 540-570nm. Mientras tanto para los cultivos en 3D se utilizó el reactivo CellTiter-Glo 3D (Promega) en una relación 1/1, posteriormente, se homogeneizó la mezcla y se midió en GloMax (Promega). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. \*p <0,05

## 6.6 Ensayo de Migración celular en cultivos 2D

Los ensayos de migración celular se realizaron utilizando una cámara transwell de 24 pocillos con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  (Corning, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células BT-474 ( $3 \times 10^5$  células por pocillo) se sembraron en la parte superior de la cámara, al día siguiente se transfectaron con el si-LINC01087 por 24 hrs y posteriormente se inocularon en la parte superior de la cámara. El medio que contenía 10% de FBS se depositó en la cámara inferior como quimio atrayente. Una vez transcurridas las 72 hrs post transfección las células de la cámara superior se retiraron con un hisopo de algodón y las imágenes se capturaron y cuantificaron bajo el microscopio óptico a 10x, el recuento celular de tres membranas independientes se definió como el índice de migración.

## 6.8 Ensayos de proliferación celular en cultivos 2D y 3D de células BT-474 transfectadas con si-LINC01087

Para el análisis de proliferación celular en cultivos 2D y 3D, se utilizó el reactivo de MTT y el Kit CellTiter-Glo 3D respectivamente en las condiciones descritas previamente, sin embargo, la proliferación celular se midió cada 24 h por tres días y se leyó mediante espectrometría. El análisis estadístico utilizado fue el test de múltiples comparaciones Dunnett's. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ .

## 6.9 Ensayos de mimetismo vasculogénico

Se llevaron a cabo ensayos de mimetismo vasculogénico en cultivos celulares tridimensionales (3D) utilizando Matrigel comercial enriquecido con laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos de sulfato de heparina (Thermo Fisher Scientific), como andamiaje. Las células BT-474 ( $3 \times 10^4$  células/pocillo) se trataron con si-LINC01087 (60 nM) o scramble (60 nM), como se describió previamente. Posteriormente, las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos cubierta con Matrigel (50  $\mu\text{L}$ ). Por último, las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en condiciones de normoxia (20% O<sub>2</sub>) o hipóxicas (1% O<sub>2</sub>) durante 48 h. La formación de estructuras tridimensionales similares a canales se llevó a cabo cultivando las células en Matrigel durante 0, 3, 6, 9 y 24 h. Se tomaron imágenes en cada punto

temporal utilizando un microscopio óptico. Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

#### 6.10 Transfección del precursor del miR-130a-3p en cultivos 3D

Se transfectó un precursor de miR-130a-3p a una concentración de 30 y 60 nM, así como un control negativo de scramble a 60 nM en células BT-474 crecidas en 3D utilizando lipofectamina 2000. Para llevar a cabo las transfecciones se siguió el protocolo de transfección descrito anteriormente.

#### 6.11 Western blots

Los extractos de proteína total se aislaron de células BT-474 utilizando un buffer de lisis TNTE (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 1 mM EDTA) suplementado con 2  $\mu$ L de cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa 100X (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las proteínas (30  $\mu$ g) se separaron en SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 60 min a temperatura ambiente con TBST-1X (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween-20, a pH 7,6) que contenía 5% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.). Luego, las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios de ratón anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz Sc47724, Santa Cruz, CA, EE. UU.), anti-FOXA1 de conejo (1:100, Abcam ab23738). Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces en TBST-1X y se incubaron con anticuerpo conjugado anti cabra y ratón con peroxidasa de rábano (1:6000, Jackson Immuno Research JKSN 115-035-003, Cambridge, Reino Unido). Se utilizó un kit de detección de ECL para desarrollar las señales. Se realizaron análisis densitométricos de las bandas inmunodetectadas utilizando el paquete de software de análisis myImage.

#### 6.12 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE de tres ensayos independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Dunnett's. Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis se llevó a cabo utilizando el software gratuito GraphPad versión 9.0.

### 6.13. Análisis *in silico* de la expresión de LINC01087

Para explorar la expresión de LINC01087 en pancancer y en los subtipos moleculares de cáncer de mama se realizó un análisis *in silico* en diversas bases de datos, las cuales se caracterizan por extraer y filtrar información del Atlas del Genoma del Cáncer (GEPIA; <http://gepia.cancer-pku.cn/>, UALCAN; <https://ualcan.path.uab.edu/>, GENT2; <http://gent2.appex.kr/gent2/>). Por otro lado, el análisis de supervivencia se obtuvo mediante las curvas de Kaplan Meier (<https://kmplot.com/analysis/>), posteriormente, para la generación del gráfico se aplicaron filtros en la base de datos, las restricciones que se manejaron se representan en la tabla 2.

**Tabla 3. Parámetros clínicos utilizados para la generación de la gráfica de sobrevida mediante km-plotter.**

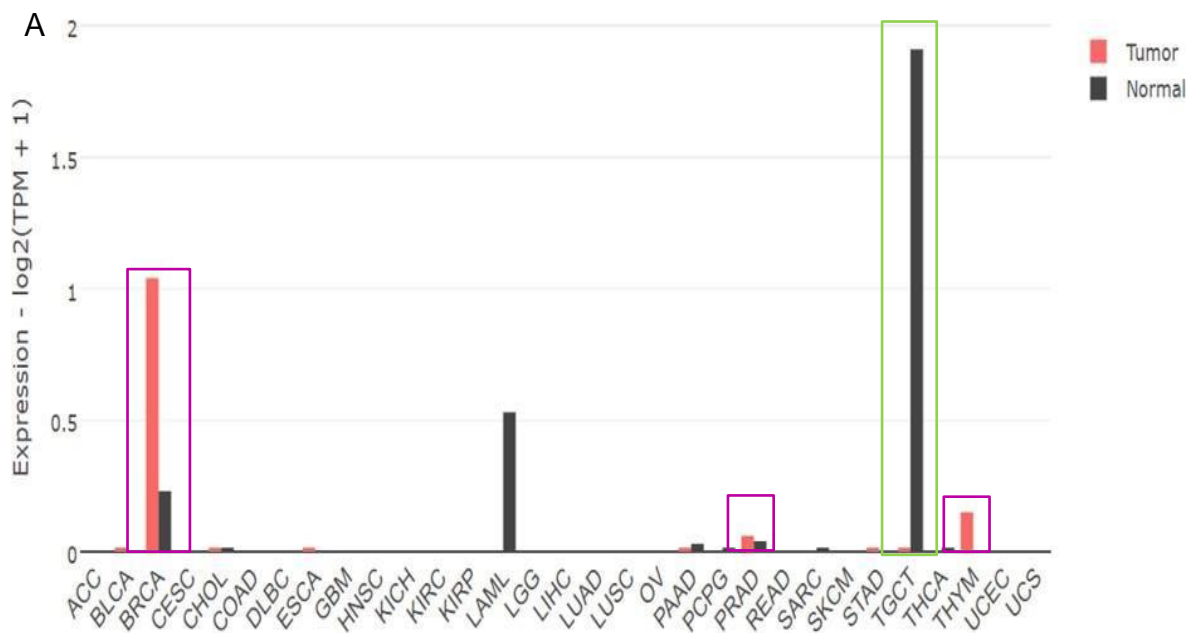
Estatus de nodos linfáticos	Negativo
Estatus ER	Positivo
Estatus PGR	Todos
Estatus HER2	Positivo
Estatus KI67	Todos
Grado histológico de Nottingham	Todos
PAM50	Todos

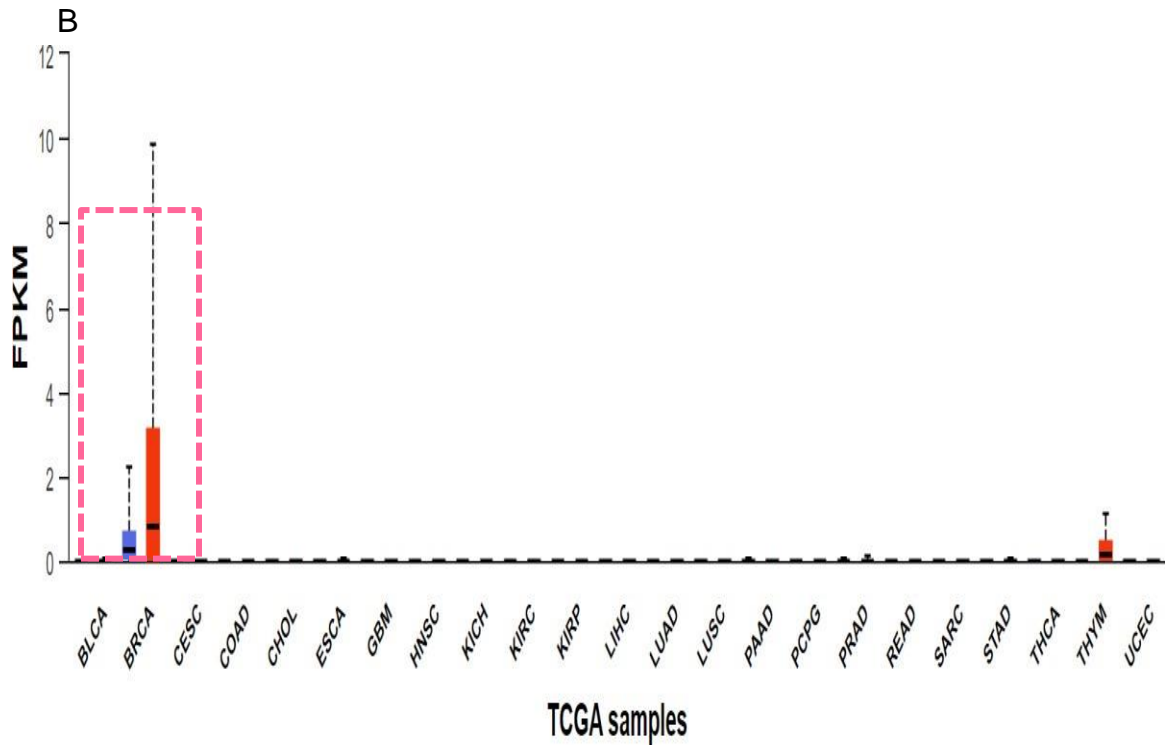
ER: Receptor de estrógenos, PGR: Receptor progesterona, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, KI67: Índice de proliferación, PAM50: Firma génica que permite categorizar los subtipos moleculares del cáncer de mama.

## VII. Resultados

### 7.1 La expresión génica de *LINC01087* es variable en los diferentes tipos de cáncer y en los subtipos moleculares del cáncer de mama.

Se realizó un análisis *in silico* en diversas bases de datos para conocer la expresión del RNA largo no codificante en los distintos tipos de cáncer. Con base al análisis de expresión de los datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), la base de datos GEPIA demostró que la expresión de *LINC01087* se encuentra expresada diferencialmente en distintos tipos de cáncer; en tejidos tumorales de cáncer de mama la expresión de *LINC01087* se encuentra sobre expresada en comparación con tejido normal, así mismo en el carcinoma tímico y en el adenocarcinoma prostático. Por el contrario, en tumores que se forman en la membrana sinovial, la vaina tendinosa, o la bolsa sinovial (tumores TGCT) la expresión de *LINC01087* está notoriamente reducida respecto al tejido normal (Figura 10A). Adicionalmente la expresión de *LINC01087* en pan cáncer también se analizó en la base de datos UALCAN, donde los resultados fueron consistentes con GEPIA (Figura 10B).

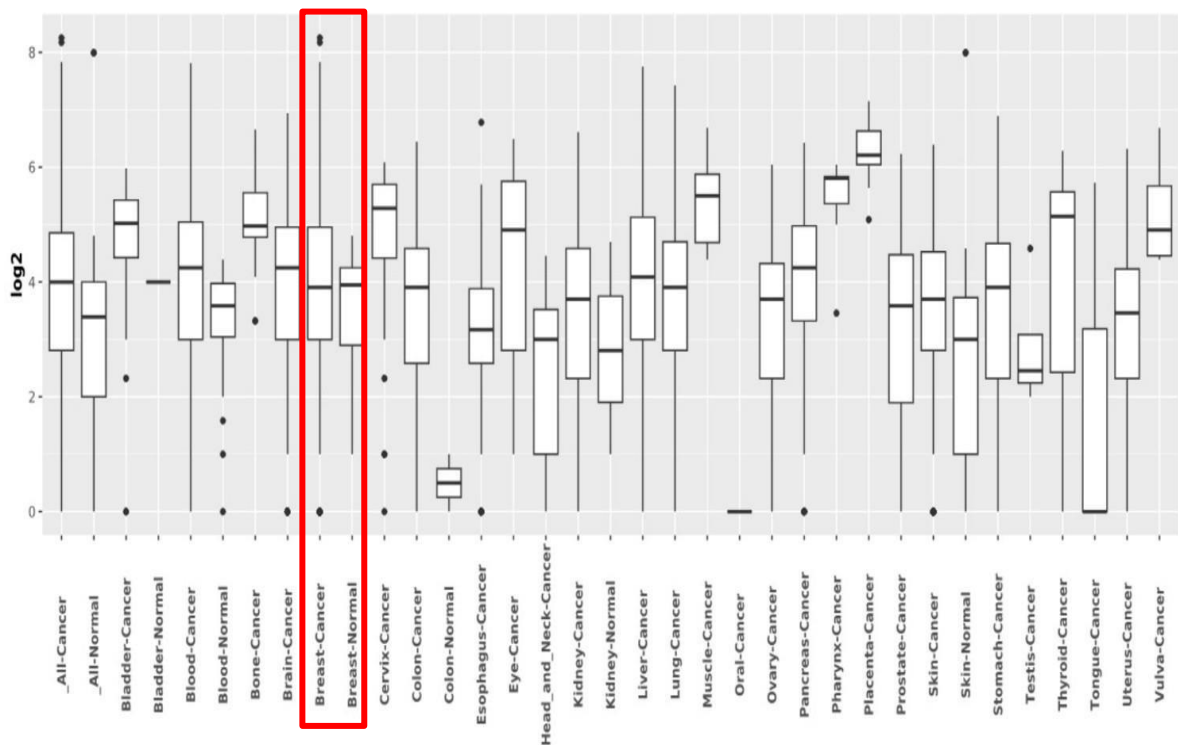




**Figura 10. Perfil de la expresión génica del LINC01087 en tejido sano y tumoral en cáncer.** (A). Gráfico de barras obtenido mediante gene Expression Profiling Interactive Analysis GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). (B) Gráfico de barras obtenido mediante la base de The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>)  $P < 0.00000045$ . ACC: Carcinoma de la corteza suprarrenal, BLCA; Carcinoma urotelial de vejiga, BRCA; Carcinoma invasivo de mama, CESC; Carcinoma de células escamosas cervicales y adenocarcinoma endocervical, CHOL; Colangiocarcinoma, COAD; Adenocarcinoma de colón, DLBC; Linfoma difuso de células B grandes, ESCA; Carcinoma esofágico, GBM; Glioblastoma multiforme, HNSC; Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, KICH; Cromóforo renal, KIRC; Carcinoma renal de células claras, KIRP; Carcinoma renal de células papilares, LAML; Leucemia mieloide aguda, LGG; Glioma cerebral de grado inferior, LIHC; Carcinoma hepatocelular hepático, LUAD; Adenocarcinoma de pulmón, LUSC; Carcinoma de células escamosas de pulmón, MESO; Mesotelioma, OV; Cistoadenocarcinoma seroso de ovario, PAAD; Adenocarcinoma de páncreas, PCPG; Feocromocitoma y paraganglioma, PRAD;

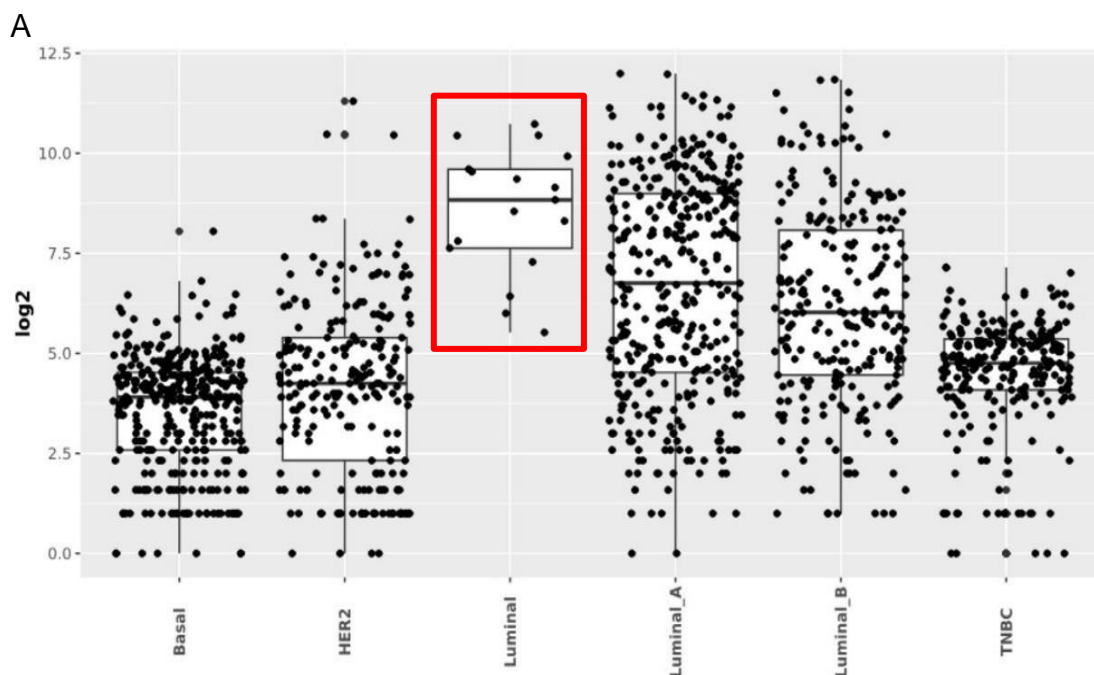
Adenocarcinoma de próstata, READ; Adenocarcinoma de recto, SARC; Sarcoma, SKCM; Melanoma cutáneo de piel, STAD; Adenocarcinoma de estómago, TGCT; Tumores de células germinales testiculares, THCA; Carcinoma de tiroides, THYM; Timoma, UCEC; Carcinoma endometrial del cuerpo uterino y UCS; Carcinosarcoma uterino.

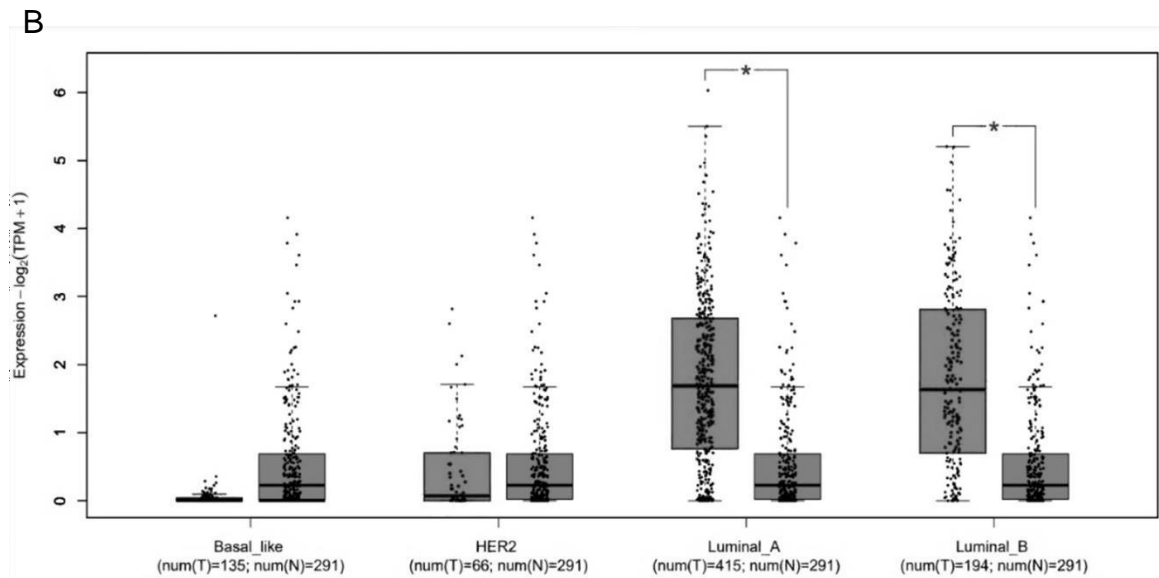
Posteriormente mediante la base de datos GENT2 se analizó la expresión del *LINC01087* en diferentes líneas celulares utilizadas en condiciones cancerosas y en condiciones normales (Figura 11). En la gráfica de caja y bigote se observó que todas las líneas celulares de diferentes tipos de cáncer generalmente tienen una sobreexpresión de *LINC01087* respecto a las líneas celulares derivadas de tejidos normales. En cáncer de mama, hay líneas celulares que muestra una mayor expresión del *LINC01087*.



**Figura 11. Expresión génica del LINC01087 en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer.** Grafica de caja y bigote obtenido mediante Gene Expression Database GENT2 (<http://gent2.appex.kr/gent2/>) of normal and tumor tissues.

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama se clasifica en varios subtipos moleculares; el basal, el luminal A, el luminal B, HER2 y TNBC. Estudios precedentes han demostrado que hay una sobre expresión del *LINC01087* sin embargo esta es diferencial entre algunos subtipos moleculares de cáncer de mama (She *et al.*, 2020), por lo cual, mediante el uso de las bases de datos GENT2 y GEPIA2 analizamos los perfiles de expresión del *LINC01087* entre los subtipos moleculares de cáncer de mama. En este gráfico observamos como los subtipo molecular Luminal A y B son los subtipos que muestran un mayor incremento en los niveles de expresión respecto a los demás subtipos, esto puede indicar que la sobreexpresión del *LINC01087* en cáncer de mama podría servir como un nuevo biomarcador específico para los subtipos luminales (Figura 12).

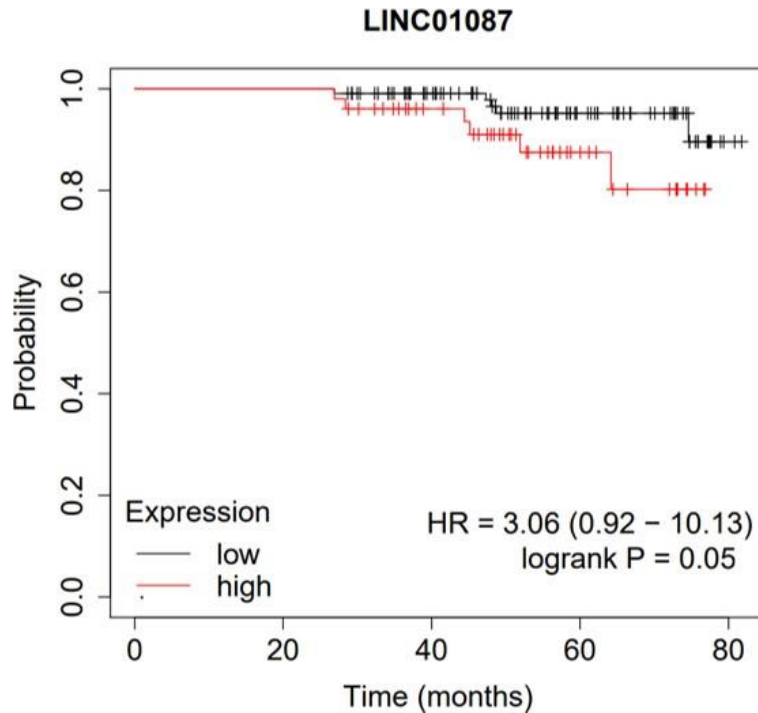




**Figura 12. Perfil de expresión del LINC01087 en los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama.** (A). Gráfico de cajas y bigotes obtenido mediante GENT2., (B) Grafico de cajas y bigotes obtenido mediante la base de datos GEPIA2. Datos normalizados  $\log_2$  (TPM+1),  $P < 0.001$ . Prueba T de muestras independientes.

### 7.2 La sobreexpresión del LINC01087 predice un menor tiempo de vida en las pacientes con cancer de mama

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de *LINC01087* tiene un impacto en la supervivencia de los pacientes con BC, se analizaron datos de sobrevida mediante los gráficos de Kaplan-Maier (KM) para *LINC01087*, para ello se utilizó el software de Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) en pacientes de cáncer de mama. Al analizar los gráficos proporcionados, se observó que la supervivencia de pacientes de cáncer de mama, cuyo tejido tumoral mostraba una sobreexpresión de *LINC01087* se relaciona a una baja sobrevida comparado con los pacientes que tiene una baja expresión de este lncRNA (Figura 13). En este sentido es importante recordar que según el análisis *in silico* de la expresión de *LINC01087* en los distintos subtipos de BC, esta sobreexpresión se da principalmente en el subtipo luminal respecto al subtipo TNCB el cual fue el que mostró una subexpresión de *LINC01087* comparado con el tejido normal.



**Figura 13. Análisis de supervivencia en pacientes con BC con sobreexpresión de LINC01087.** Rojo: sobreexpresión; Negro; subexpresión. Supervivencia dividida por la media de expresión del *LINC01087* en cáncer de mama. Valor de corte: -1,45 obtenido a través de KMplotter.

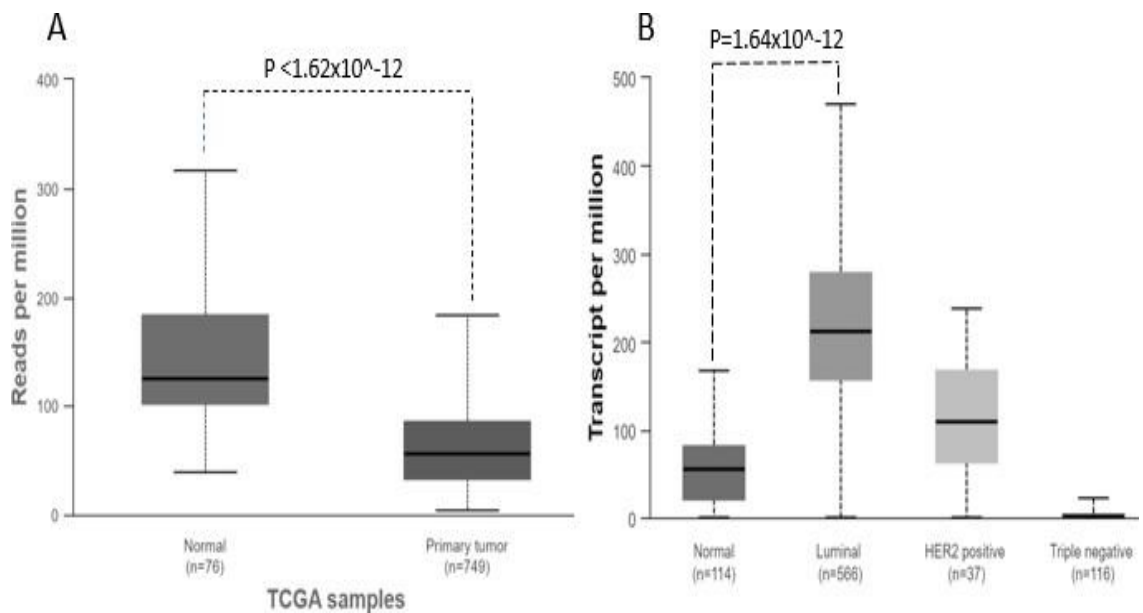
### 7.3 El miR-130a-9p se encuentra subexpresado mientras que la expresión de la proteína FOXA1 se muestra elevada en BC

Adicionalmente, para tener un respaldo bioinformático del eje de correulación propuesto, se analizó la expresión del miR-130a-3p en la base de datos UALCAN como se esperaba, el miR-130a-3p se encontró subexpresado en muestras de tumor mamario respecto al tejido mamario sano, esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=1.62 \times 10^{-12}$ ) (Figura 14A),.

Curiosamente, al analizar la expresión del gen que codifica para la proteína FOXA1, se analizó la expresión FOXA1 en los principales subtipos moleculares de cáncer de mama en la base de datos UALCAN y, como se observa en el gráfico de barras

obtenido, el subtipo molecular que muestra una mayor expresión es el subtipo luminal (Figura 14B), lo que a su vez respalda nuestro eje de regulación propuesto.

LA diferencia en los niveles de expresión de *LINC01087* con respecto a los subtipos moleculares de cáncer de mama es significativo, por lo que este hallazgo aunado a la expresión del miR-130a-3p y FOXA1 podría estar indicando que el eje propuesto es específico de los subtipos luminales.

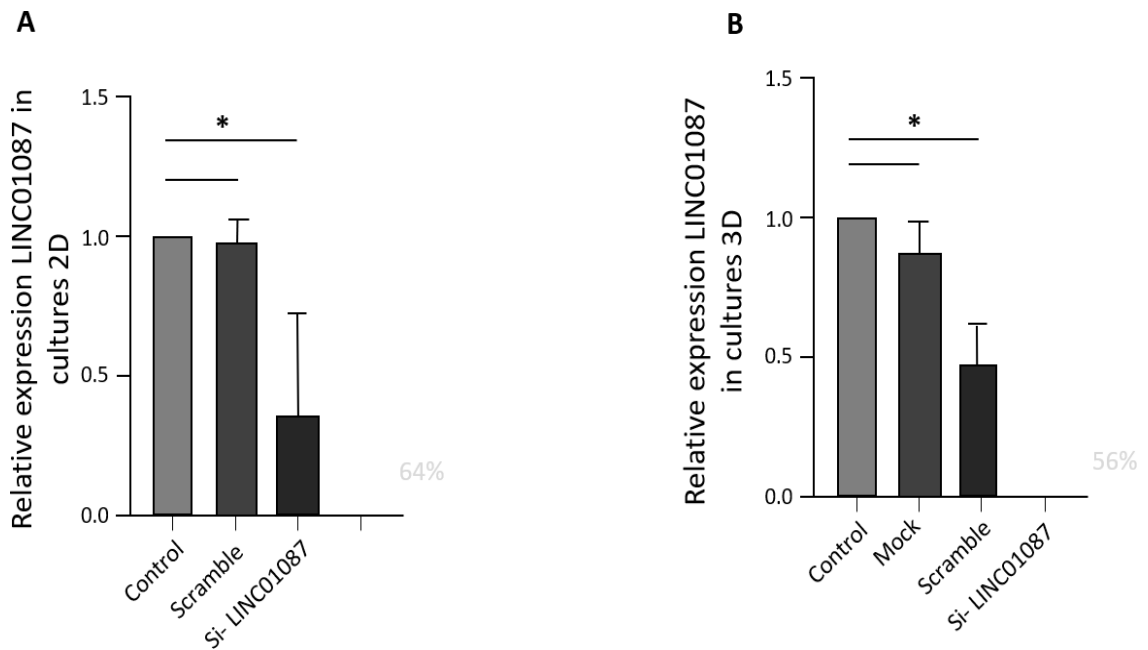


**Figura 14. Expresión de las moléculas involucradas en el eje de correlación *LINC01087*/miR130a-3p/FOXA1 en BC.** (A) Perfil de expresión del miR-130a-3p en tejido normal de mama vs tejido de tumor primario. (B) Perfil de expresión de FOXA1 en los subtipos moleculares de cáncer de mama. Gráficas de barras obtenidas mediante la base de datos UALCAN.

#### 7.4 Las células transfectadas con el si-LINC01087 crecidas en 2D y 3D muestran disminución de la expresión del LINC01087

Para confirmar experimentalmente el eje propuesto LINC01087/miR-130a-3p/ FOXA1 se procedió a realizar el silenciamiento de la expresión del *LINC01087* utilizando un RNAi del tipo siRNA específico (si-*LINC01087*) en las células BT-474 (luminal B), este RNAi impacta en la posición 2789 nt de dicho lncRNA. Para verificar que la transfección del siRNA mediante la formación de complejos con ayuda de la lipofectamina 2000 (ver metodología) se realizó de manera satisfactoria, procedimos a realizar una RT-qPCR.

El análisis de los datos obtenidos demostró que en las células BT-474 crecidas en 2D y transfectadas por 24 h con el siRNA a una concentración de 60nM disminuyó la expresión de *LINC01087* en aproximadamente un 64% respecto a las células que no fueron sometidas al tratamiento de transfección (ST) y a las células control negativo, las cuales fueron transfectadas con el scramble [60nM] (Figura 15A). Una vez que comprobamos la eficiencia del RNAi comenzamos con la metodología para transfectar el si-*LINC01087* en los cultivos crecidos en 3D (se describe en el apartado de metodología), es decir, con geltrex, el cual como vimos en los antecedentes, es de suma importancia para recrear parcialmente el microambiente tumoral. Al analizar la expresión del *LINC01087* a las 24 h de transfección no se vio una disminución de la expresión estadísticamente significativa, por lo que aumentamos el tiempo de transfección a 48 h. Al analizar la expresión a este tiempo, se observó que disminuyó la expresión de *LINC01087* en un 56%, esta disminución fue estadísticamente significativa respecto al grupo de células control y si-scramble (Figura 15B).



**Figura 15. Expresión de LINC01087 en células transfectadas con si-LINC01087.**

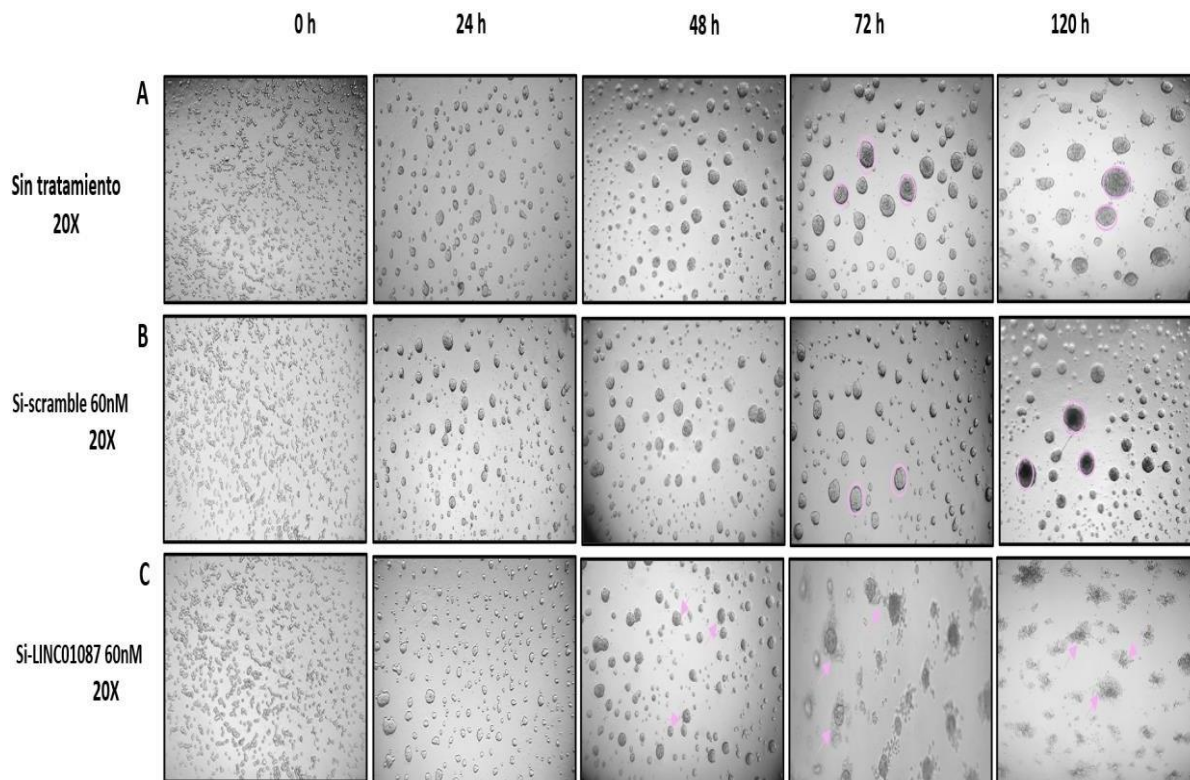
A. Expresión relativa de linc01087 en células cultivadas en monocapa transfectadas con si-LINC01087 (60 nm) 24 h después de la transfección. B. Expresión relativa de linc01087 en células cultivadas en 3D transfectadas con si-LINC01087 (60 nm) 48 h después de la transfección. Se analizaron 500 ng de RNA. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ . Anova one way-Test dunett's.

### *7.5 Las células BT-474 crecidas en 3D transfectadas con si-LINC01087 muestran un cambio en la formación de esferoides*

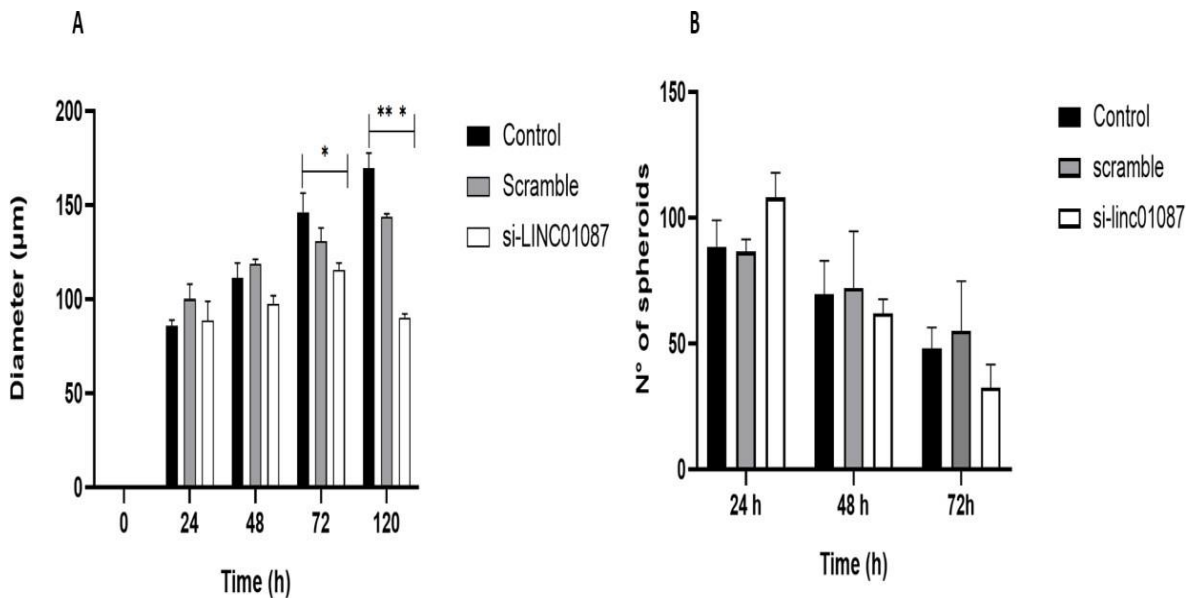
La línea celular BT-474 comercial, se extrajo del tumor de una mujer con carcinoma ductal invasivo, esta línea se caracteriza por ser positiva para los ER+, PR+ y HER2+. La morfología de esta línea se caracteriza por la formación de "parches" de células adherentes y estas presentan un crecimiento lento y hasta tres semanas son necesarias para llegar a una confluencia del 80% por lo que para determinar si las células deficientes de LINC01087 exhibían un cambio en la morfología usual, realizamos seguimiento de la morfología celular después de la transfección en un periodo de tiempo que va desde las 0h hasta las 120h entre las células control (no

transfectadas) (Figura 16A), las células control negativo (si-scramble) (Figura 16B) y las células si-*LINC01087* (Figura 16C).

Como se muestra en la figura 16, en las primeras 24 h no se observa una diferencia en la formación de esferoides en las tres condiciones de trabajo; sin embargo, a las 48 h se empieza a observar un cambio en la morfología de las células deficientes de *LINC01087*. Este comportamiento se ve exacerbado a las 72 h, en este intervalo de tiempo, los esferoides empiezan a cambiar la morfología típica de esta línea celular en 3D, la cual se puede observar en los grupos control como una morfología redonda. El punto máximo de cambio en la morfología fue a las 120 h, a este tiempo se puede observar un tipo de estructuras que rodean al esferoide (flechas rosas), así mismo, podemos observar un compartimiento similar en las células control, donde predomina el aumento del diámetro de los esferoides (figura 17A) y una disminución en el número de esferoides (figura 17B), este patrón de crecimiento es contradictorio al de las células si-*LINC01087*, en estas observamos una disminución tanto del número como del diámetro de las estructuras tridimensionales.



**Figura 16. La deficiencia de *LINC01087* disminuye el tamaño y número de esferoides de las células BT-474 .** Crecimiento de la línea celular de cáncer de mama luminal B de tiempo 0 a 120 horas en las condiciones sin tratamiento (A), transfectadas con si-scramble (B), y células si-LINC01087 (C).



**Figura 17. La deficiencia de LINC01087 disminuye el tamaño y número de esferoides de las células BT-474.** A. Diámetro de los esferoides calculado a partir del perímetro mediante el software ImageJ. B. Número de los esferoides. La barra representa la desviación estándar  $n=3$ , media  $\pm$  DE obtenida de triplicados). ANOVA de una vía, seguido de un test de Tukey  $P < 0.05$ .

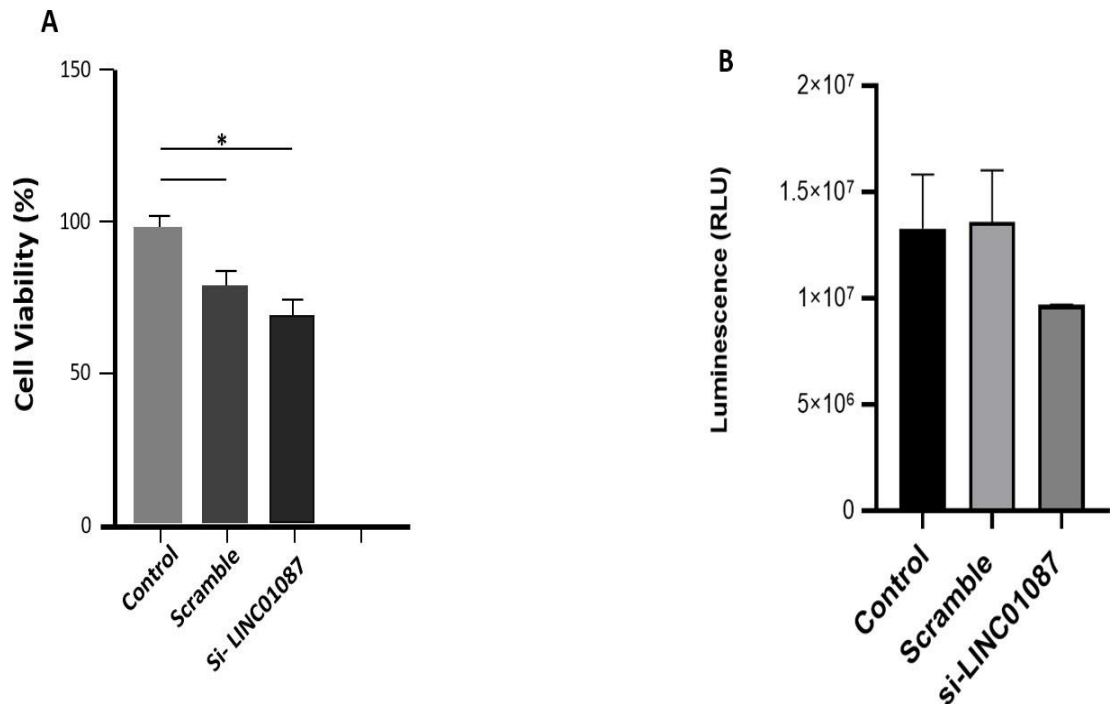
## 7.6 Determinación del efecto funcional de la deficiencia de LINC01087

### 7.6.1 La deficiencia de la expresión del LINC01087 impacta en la viabilidad de las células BT-474 crecidas en 2D y 3D

Una vez comprobada la disminución de la expresión de LINC01087 tanto en cultivos monocapa como en los cultivos crecidos con matrigel (3D), nuestro siguiente objetivo era comprobar si esta deficiencia tenía algún impacto en la viabilidad celular, por lo que las células BT-474 crecidas en 2D deficientes de LINC01087 se sometieron a un ensayo de viabilidad celular mediante el reactivo tetrazolio amarillo (MTT) en un método colorimétrico en el que esta sustancia reacciona con el NADPH de las células metabólicamente activas, es decir, entre más oscuro sea el color morado, mayor es el número de células metabólicamente activas, lo cual indirectamente nos indica la

viabilidad celular. Este ensayo nos demostró que la transfección reduce la viabilidad celular en comparación con las células sin tratamiento y las si-scramble (Figura 18A).

Por otro lado, el ensayo de viabilidad celular en los cultivos en 3D se realizó mediante el kit CellTiter-Glo 3D, este reactivo tiene la capacidad penetrar y de lisar a los esferoides, para así poder interactuar con el ATP producido por las células sirviendo, así como un indicador de viabilidad celular al emitir luminiscencia. Los datos obtenidos mediante este ensayo nos indican que, de manera interesante, la viabilidad celular en los cultivos en 3D disminuye (Figura 18B), sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa comparada con las células control. Un dato importante arrojado en este ensayo es que en los cultivos en 3D la disminución no es tan marcada como ocurrió con el ensayo de viabilidad en los cultivos en 2D.



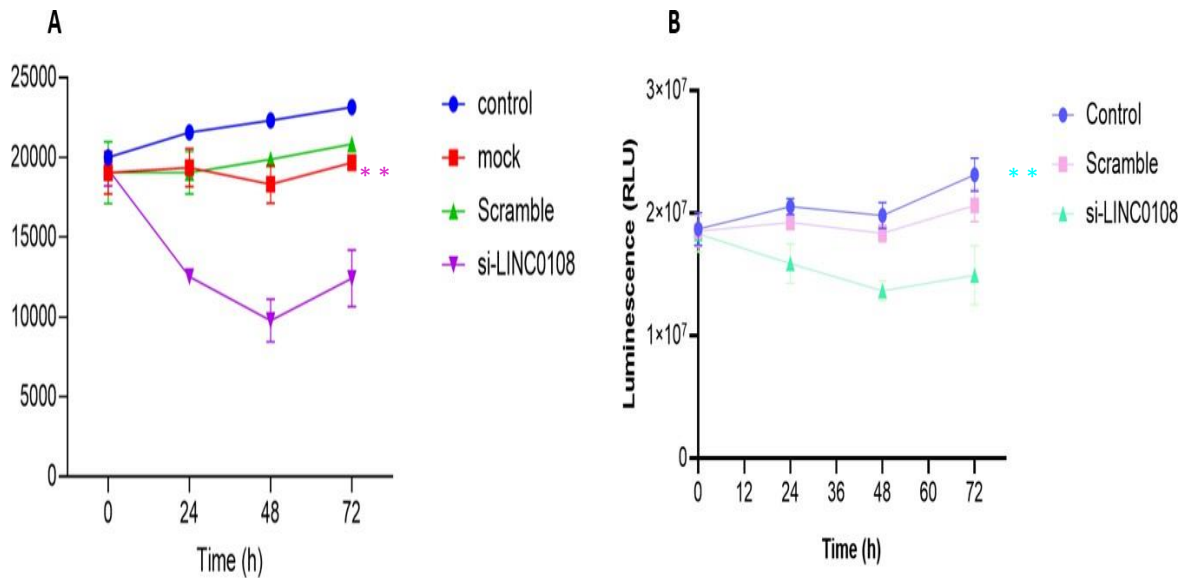
**Figura 18. La deficiencia de LINC01087 impacta en la viabilidad celular en la línea BT-474.** (A). Ensayos de viabilidad de células BT-474 cultivadas en monocapa transfectadas con si-LINC01087 (60nM), Scramble, Mock y no transfectadas por 24 h. (B). Ensayo de viabilidad celular de células BT-474 cultivadas en 3D transfectadas con si-LINC01087 por 48 h, en las condiciones de A, utilizando CellTiter-Glo® 3D. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. \*p <0,05.

### 7.6.2 *Las células si-LINC01087 disminuyen la capacidad proliferativa celular en cultivos crecidos en 2D y 3D*

Se ha demostrado que *LINC01087* se encuentra estrechamente involucrado en la capacidad proliferativa de células de BC del subtipo TNCB ((She *et al.*, 2020), sin embargo, aún no se encuentra documentada la participación de *LINC01087* en las células BT-474 las cuales son pertenecientes al subtipo luminal B. Debido a este planteamiento, nos preguntamos si el silenciamiento de *LINC01087* en los cultivos crecidos en 2D y 3D impactarían en la proliferación celular.

El ensayo de proliferación celular se llevó a cabo en los cultivos 2D mediante el reactivo de MTT (sección de metodología) documentando en un intervalo de tiempo que va de las 0h a 72 h (Figura 19A). En la gráfica obtenida se puede observar que a partir de las 24 h post transfección, las células si-*LINC01087* muestran un decremento de la capacidad proliferativa la cual resultó ser estadísticamente significativa comparada con el grupo de células control, lo contrario ocurrió con las células si- scramble, las cuales mostraron un comportamiento similar a las células control, lo que nos estaría indicando que el comportamiento de las células si-*LINC01087* no es producto del tratamiento metodológico.

Curiosamente, al llevar acabo el ensayo de proliferación celular en los cultivos en 3D mediante el kit CellTiter-Glo 3D en el mismo intervalo de tiempo (0h-72h) (Figura 19B) post transfección, pudimos percatarnos que las células si-*LINC01087* adoptaron un comportamiento similar a las células crecidas en 2D, es decir, a partir de las 24 h se observa un decremento en la proliferación celular y al pasar del tiempo la tendencia fue exacerbándose, este patrón se observó con menor intensidad en los cultivos 2D .



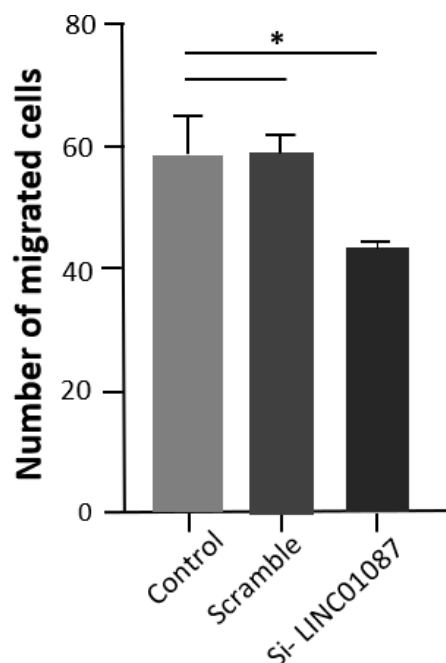
**Figura 19. La deficiencia de LINC01087 disminuye la capacidad proliferativa de las células de cáncer de mama.** (A). Proliferación de células BT-474 cultivadas en monocapa y cuantificadas cada 24 horas durante 3 días mediante el reactivo MTT. (B). Proliferación de células Bt-474 cultivadas en tres dimensiones y cuantificadas cada 24 horas durante 3 días mediante el reactivo CellTiter-Glo® 3D test de múltiples comparaciones Dunnett's. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ .

### 7.6.3 El silenciamiento de la expresión del LINC01087 disminuye significativamente la migración celular de la línea BT-474 de cáncer de mama en 2D

Como se menciona en los antecedentes, se ha reportado que LINC01087 está sobreexpresado en los cultivos en 3D de esta línea celular, mientras que el miR-130a-3p se encuentra a la baja provocando que la proteína FOXA1 se encuentre sobreexpresada. Esta proteína en particular está involucrada en un aumento de la migración celular. La migración celular es un fenómeno molecular importante para la progresión del cáncer, por lo que decidimos verificar si el eje propuesto mediante herramientas bioinformáticas (LINC01087/miR-130a-3p/FOXA1) impactaba en la migración celular de las células BT-474.

Una vez que se comprobó que el silenciamiento de *LINC01087* impactaba en la viabilidad y la capacidad proliferativa, nos preguntamos si tendría algún efecto en la capacidad migratoria de las células BT-474 por lo que se procedió a realizar ensayos de migración celular mediante cámaras transwell como se describe en el apartado de metodología. Una vez transcurridas las 72 h se realizó el conteo de las células que lograron atravesar la membrana (Figura 20).

Los resultados demostraron que el silenciamiento de *LINC01087* resultó en una disminución estadísticamente significativa de la migración celular en comparación con las células control, es decir las células no transfectadas y las células transfectadas con scramble, sin embargo, se espera que esta tendencia se vea aumentada a las 48 h de transfección, lo cual quedará como una perspectiva para aplicar en las células crecidas en un ambiente tridimensional.



**Figura 20. Migración celular de células si-LINC01087.** Se realizaron ensayos de migración celular mediante cámaras transwell, la membrana tiene un tamaño de poro de 8µm. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media ± DE. \*p <0,05. Test Dunett's.

#### *7.6.4 La disminución de la expresión de LINC01087 en células de BC subtipo luminal B inhibe la formación de mimetismo vasculogénico en un ambiente tridimensional*

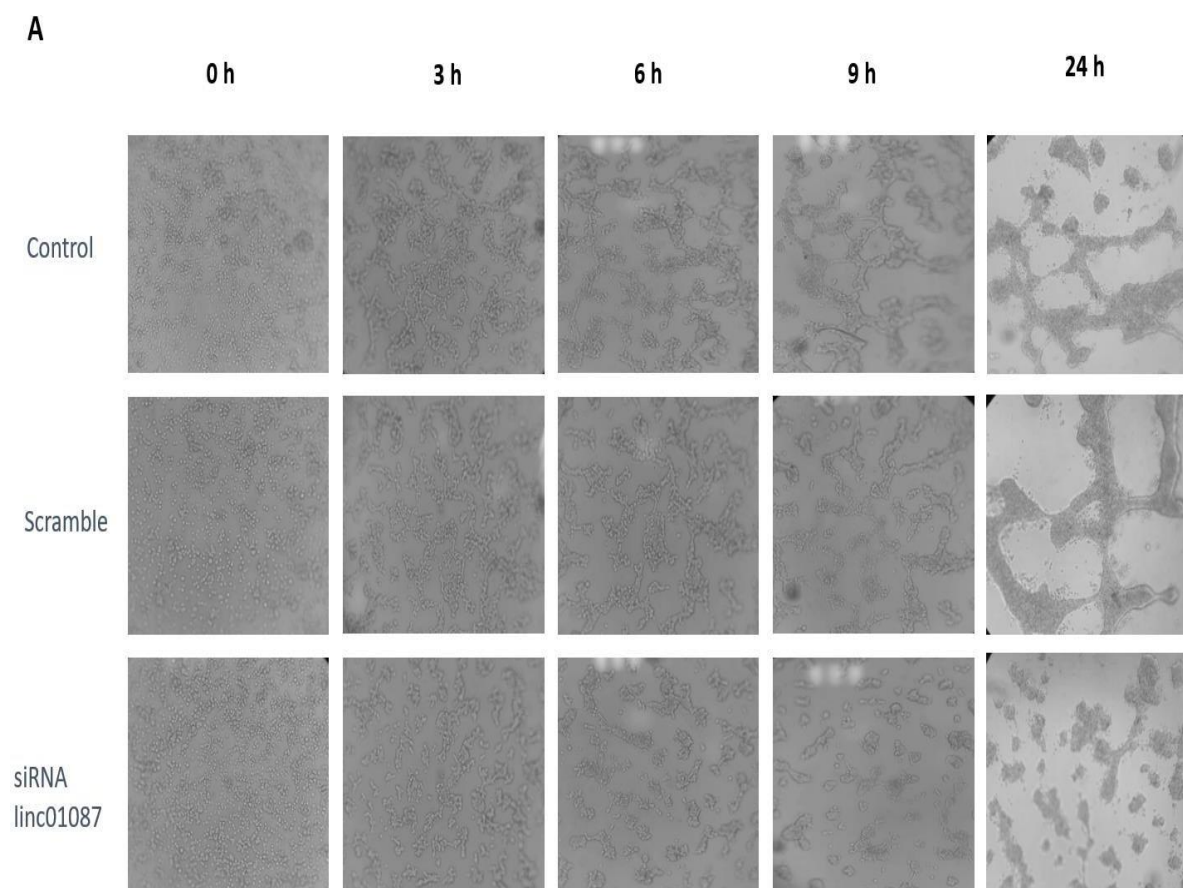
En la actualidad, diversos grupos de investigación se han dedicado a descifrar la importancia del gradiente de O<sub>2</sub> que se genera en el microambiente tumoral, se ha reportado ampliamente que la hipoxia es un factor clave para la progresión del cáncer, la importancia radica en la formación de canales (Luo *et al.*, 2020), los cuales sirven como una red bien organizada que suministra tanto nutrientes como oxígeno a los tumores sólido, por lo que nos preguntamos si las células deficientes de LINC01087, mediante el eje de correulación propuesto LINC01087/hsa-miR-130a-3p/FOXA1 podría regular procesos involucrados con la hipoxia celular como es el mimetismo vasculogénico.

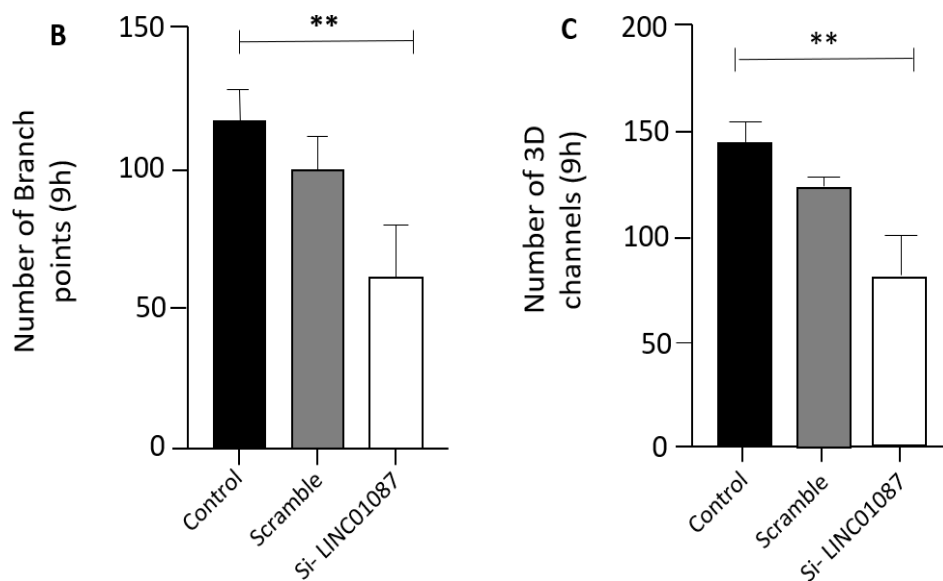
Los resultados de este ensayo mostraron que las células BT-474 deficientes de LINC01087 y sometidas a hipoxia por 48 h, inhiben totalmente el mimetismo vasculogénico respecto a las células control (Figura 21A). Posteriormente se realizó el conteo de nodos y canales (Figura 21 B,C) para poder aplicar la prueba estadística de ANOVA de una vía.

La formación de estructuras tubulares que funcionan como vasos sanguíneos para alimentar al tumor sólido. En las células control y las células transfectadas con si-scramble se pudo observar a partir de las 3h el comienzo de formación de canales, ya que la morfología de las células BT-474 comienza a pasar de perfectamente redondas a células con morfología alargada, así mismo, en este intervalo de tiempo se empezaron a identificar estructuras típicas del mimetismo vasculogénico llamados nódulos, este comportamiento se exagera a las 6 h ya que se empezó a observar la fusión celular para la formación de canales, sin embargo, las fotografías a las 9 h muestran el punto máximo de formación tanto de túbulos como de canales, para finalizar el experimento se tomó una última fotografía a las 24 h, curiosamente a este tiempo, las células se fusionaron por completo, de modo que comienzan a retomar su estructura tridimensional típica, es decir en forma de masa, a las 24 h se observa un menor número de canales y nódulos, sin embargo, estos aumentan en área, este patrón es contundente con los resultados obtenidos en el análisis de formación, número y tamaño de los cultivos en 3D que obtuvimos anteriormente y son

consistentes con otros trabajos en 3D (Nuñez-Olvera *et al.*, 2022; Salinas-Vera *et al.*, 2022).

De manera interesante pudimos observar un comportamiento totalmente diferente en las células si-*LINC011087*, ya que a las 3 h no hay un cambio con respecto a las células control, sin embargo, a las 6 h en lugar de observar el comienzo de la formación de canales, solo pudimos observar la formación de nódulos, a las 9 h fue el tiempo de mayor diferencia, ya que pareciera que las células comenzaron a re agruparse para la formación de los esferoides típicos de esta línea celular. Por lo que, a raíz de los datos obtenidos de este ensayo, podemos deducir que el silenciamiento de la expresión de *LINC01087* inhibe la formación de mimetismo vasculogénico en las células BT-474 en BC.





**Figura 21. El Silenciamiento de LINC01087 inhibe el mimetismo vasculogénico en células de cáncer de mama luminal B.** Las células BT-474 se transfectaron con scramble o si-LINC01087 (60 nM) durante 48 h al mismo tiempo que las células se sometieron a hipoxia durante 48 h y se sembraron en Matrigel durante 24 h para el ensayo de formación de túbulos. (A) Células de control (panel superior), mezcla [60 nM] (panel central), células transfectadas con si-LINC01087 (panel inferior). (B) Número de puntos de bifurcación. (C) Número de canales 3D después de 9 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. ANOVA unidireccional. \*\* $p < 0,001$ .

### 7.6.5 Efecto del silenciamiento de LINC01087 y de la sobreexpresión del miR-130a-3p sobre la abundancia de la proteína FOXA1 en la línea celular de BC subtipo luminal B crecidas en 3D

Una vez que comprobamos que la deficiencia de la expresión de LINC01087 en la línea celular BT-474 impacta en los diferentes Hallmarks del cáncer de mama, quisimos seguir con la dirección del eje de correulación propuesto: LINC01087/hsa-miR-130a-3p/FOXA1, por lo que el siguiente paso fue analizar la expresión de nuestra última molécula de interés FOXA1.

Hasta el momento hemos comprobado que el eje de correulación impacta a un nivel post transcripcional, sin embargo, aún desconocemos si este eje puede influir a nivel post traduccional, es decir a nivel de proteína, por lo que nos preguntamos como este silenciamiento impacta en la abundancia de la proteína FOXA1. Como se ha mencionado en los antecedentes, la proteína FOXA1 ya ha sido reconocida por su amplio papel en el desarrollo maligno en cáncer de mama, por lo que se ha propuesto esta molécula como un posible biomarcador de pronóstico en BC (Metovic *et al.*, 2022).

Nuestro análisis *in silico*-nos corroboró que la expresión de FOXA1 se ve aumentada en el subtipo luminal B, mientras que la expresión del miR-130a-3p se ve reducida, es por eso que nosotros realizamos experimentos con la técnica western blot, esta técnica nos permite detectar la abundancia de la proteína en cuestión. En estos ensayos manejamos cinco condiciones; células control, células si- scramble, células si-LINC01087 y células transfectadas con el precursor del miR-130a-3p a 30 y 60nM, esto último con la finalidad de restaurar la expresión del miRNA.

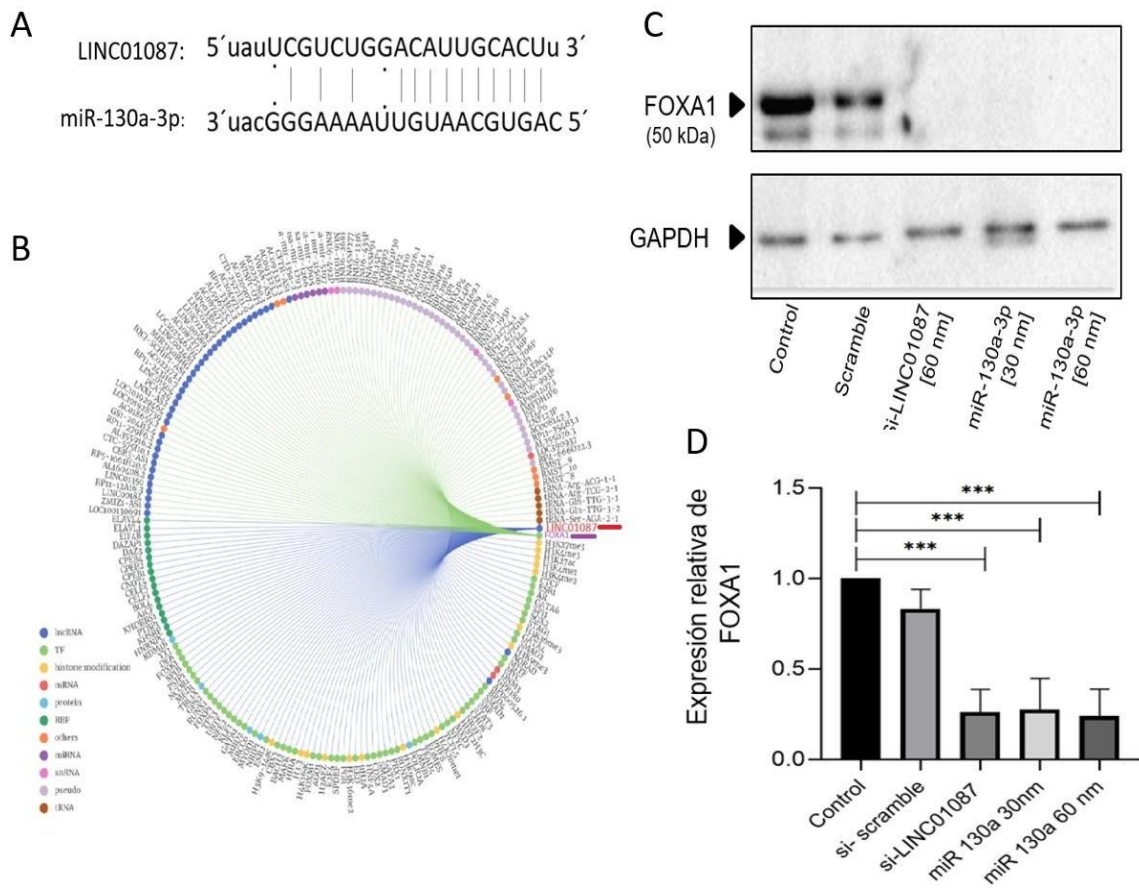
Antes de realizar el ensayo de wester blot realizamos una búsqueda bioinformática mediante el software de RNAINTER, para conocer los posibles blancos de LINC01087 a nivel transcripcional y post transcripcional (Figura 22B). Nos llevamos una gran sorpresa al descubrir que LINC01087 podría estar interactuando directamente con la proteína FOXA1.

Posteriormente, se realizó la inmunodetección de la proteína FOXA1 (detallado en metodología) en las cinco condiciones antes mencionadas. Los resultados indican que tanto el silenciamiento de LINC01087 como la sobreexpresión del miRNA-130a-3p

provocan una disminución de la proteína FOXA1 respecto a los grupos controles (Figura 22C)

Al llevar a cabo el análisis densimétrico de las bandas inmunodetectadas en la membrana (Figura 22D) se confirmó que la diferencia en la expresión de la proteína FOXA1 es estadísticamente significativa.

Los resultados de estos ensayos, nos indican que el eje propuesto mediante herramientas bioinformáticas LINC01087/hsa-miR-130a-3p/FOXA1 se está llevando a cabo en los cultivos crecidos tridimensionalmente, lo que estaría demostrando que LINC01087 está ejerciendo una función de “secuestro o esponjeo” sobre el miR-130a-3p y por consecuencia estaría restringiendo la función reguladora del miR-130a-3p sobre el RNAm de la proteína FOXA1.



**Figura 21. Inmunodetección de la proteína FOXA1.** (A) Región complementaria del LINC01087 con el miR-130<sup>a</sup>-3p. obtenido mediante la base de datos encori. (B). Top 100 de las interacciones de LINC01087 (parte superior) y de FOXA1( parte inferior) representada en una gráfica de cuerdas. Obtenido mediante <http://www.rnainter.org/> (C) Ensayos de western blot para FOXA1 en extractos proteicos totales obtenidos de células de cáncer de mama BT-474. (D). Representación gráfica de la cuantificación de las bandas inmunodetectadas en A. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresan como la media  $\pm$  DE \*\*\*  $p < 0.0001$

## VIII. Discusión

En la actualidad el panorama sobre el estudio del cáncer se encuentra incierto, particularmente el cáncer de mama se encuentra lejos de encontrarse totalmente elucidado, esto debido a la gran heterogeneidad celular inter e intrínseca que conforman este tipo de neoplasia. Sin embargo, diversos autores han demostrado que los cultivos en 3D estarían representando con mayor semejanza lo que ocurre en el microambiente tumoral *in vivo* (Jubelin *et al.*, 2022), lo que ha proporcionado una nueva visión sobre el abordaje del estudio del cáncer y el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

El uso de hidrogeles en cultivos en 3D estimula el crecimiento celular en forma de esferoides sólidos, esta estructura permite diferenciar los diversos estados celulares que componen un esferoide, en donde se encuentran las células altamente proliferantes en la capa exterior seguidas de las células inactivas, hipóxicas y necróticas (Lin and Chang, 2008). Así mismo, los componentes de estos hidrogeles en los cultivos tridimensionales son responsables de la supervivencia y muerte celular, debido a que dependen de la adhesión celular y de los componentes de la matriz extracelular (Santini, 2000). Sin embargo, aún no se ha esclarecido cómo las redes de correlación lncRNAs/miRNAs/mRNAs participan en la progresión tumoral en cultivos 3D de cáncer de mama y cómo estos presentan una expresión diferencial respecto a los cultivos en monocapa.

En este trabajo se estudió la red de correlación LINC01087/miR-130a-3p/ FOXA1. Por lo que como primer paso se realizó un análisis *in silico* para determinar la expresión de LINC01087 en pancancer, se encontró que este RNA largo no codificante tiene una expresión variable dependiendo el tipo de cáncer, siendo el cáncer de mama la neoplasia con mayor expresión de LINC01087 esto concuerda con el análisis *in silico* reportado anteriormente, donde los datos recopilados mediante dos bases de datos (TCGA y GEO) concuerdan con nuestros hallazgos (She *et al.*, 2020), por el contrario, en los tumores de células germinales testiculares observamos una pobre expresión de este lnc (long non coding), curiosamente en el tejido sano este lnc se encuentra sobre expresado, lo que podría estar indicando que LINC01087 actúa como un indicador diagnóstico para algunos tipos de cáncer relacionados con hormonas.

Posteriormente, observamos que de manera curiosa, LINC01087 se sobre expresa en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama, sin embargo, existe una diferencia significativa en la expresión de este respecto a los subtipos moleculares, nuestros resultados arrojaron una mayor expresión de LINC01087 en el subtipo luminal, el cual se caracteriza por ser positivos a los receptores hormonales (ER, PR), lo que apoya los resultados antes mencionados, los cuales apuntan a una estrecha relación entre LINC01087 y los cánceres hormonales (De Palma *et al.*, 2020). Lo anterior demuestra que nuestros resultados son consistentes con la literatura publicada sobre la abundancia en la expresión de este lnc y, a su vez, estos resultados nos sugieren que el eje propuesto en esta investigación puede ser específico para los subtipos luminales.

A continuación, evaluamos si la expresión de LINC01087 poseía un valor de pronóstico comparando con la supervivencia general de los pacientes con cáncer de mama que lo sobre expresan utilizando las cohortes proporcionadas por KM-plotter con los parámetros clínicos que se mencionan en el apartado de métodos. Sorprendentemente, nuestros hallazgos sugieren que una alta expresión de LINC01087 se encuentra asociado a un mal pronóstico y menor tiempo de sobrevida.

Anteriormente se ha reportado que los lncRNAs pueden actuar como “esponjas” de microRNAs en diversas neoplasias como es el cáncer gástrico, esofágico, mama y en glioblastomas (She *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022; Le and Nhu, 2023). Específicamente en cáncer de mama She y colaboradores estudiaron el efecto funcional del eje LINC01087/miR-135-5p/ROCK1 en cultivos bidimensionales del subtipo molecular triple negativo, ellos observaron que silenciando a LINC01087 a través de ese eje de correulación se disminuía considerablemente la proliferación, invasión y migración.

Nuestro enfoque en este trabajo fue explorar la participación del lnc LINC01087 a través del eje ya mencionado en la progresión tumoral en la línea BT-474 de cáncer de mama en cultivos 2D y 3D. Nuestro hallazgo en esta investigación es que, al silenciar a LINC01087 mediante un RNAi se observa la inhibición parcial de la capacidad proliferativa, migratoria y la viabilidad celular, curiosamente también disminuyo significativamente la capacidad de formar mimetismo vasculogénico.

Por último, al realizar los ensayos de wester blot para la inmunodetección de la proteína FOXA1 en los extractos de proteína total provenientes de las células con deficiencia de LINC01087 pudimos percatarnos que la expresión de esta proteína se ve drásticamente disminuida, el hecho de que la abundancia de la proteína FOXA1 se observó tan disminuida nos da un hilo del cual tirar, es decir, podría darnos una explicación biológica de lo que se encuentra sucediendo en las células cancerosas.

Su, Y. y colaboradores demostraron que la expresión de FOXA1 en células de cáncer de próstata promovió la proliferación, migración y formación de tubos de las células endoteliales *in vitro* (Su *et al.*, 2021), este mecanismo se atribuye a que FOXA1 aumentó la producción de factores proangiogénicos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), endotelina-1 y endoglin. Cabe resaltar, que en el análisis bioinformático que realizamos para identificar a los posibles blancos de LINC01087 tanto a nivel transcripcional como post transcripcional nos arrojó que LINC01087 puede interactuar directamente con FOXA1, es decir, sin la participación del miR-130a-3p, por lo que esta posible interacción podría abrirnos un nuevo camino de investigación.

En este sentido se ha reportado que diversos lnc están involucrados en varias modificaciones postraduccionales de proteínas, principalmente en la fosforilación, ubiquitinación y acetilación por lo que los lnc estarán regulando tanto la degradación como la formación de proteínas afectando los niveles de estas (Zhang *et al.*, 2019). El lnc lnc-DC se encuentra exclusivamente en células dendríticas humanas y posee la capacidad de modificar la abundancia de diversas proteínas; mediante ensayos de pull-down y RIP de RNA se confirmó la interacción de lnc-DC con la proteína STAT-3 (Wang *et al.*, 2014). STAT3 es una proteína que actúa como factor de transcripción que participa en casi todos los hallmarks del cáncer como la proliferación, metástasis, angiogénesis, inmunosupresión, inflamación tumoral y la reprogramación metabólica (Hu, Dong and Liu, 2024).

Como se ha venido mencionado, LINC01087 ha sido poco estudiado en cáncer de mama, sin embargo, en otros tipos de neoplasia se encuentra más elucidado su papel funcional, Ying Yin y colaboradores confirmaron el papel funcional de LINC01087 mediante un eje de correulación con el miR 135a-5p y la proteína PPM1E en tejidos

de carcinoma de tiroides, esto mediante la inhibición de LINC01087, por lo que esta investigación apoya nuestros hallazgos que afirman que LINC01087 si posee la capacidad de esponjear diversos microRNAs (Yin *et al.*, 2022). Por último, como era de esperar, todos nuestros resultados obtenidos en cultivos 2D vs. 3D mostraron concordancia, sin embargo, el efecto en los hallmarks estudiados se muestran más exacerbados en los cultivos 3D.

## IX. Conclusión

LINC01087 se encuentra sobre expresado en la línea celular de carcinoma ductal invasivo. Los pacientes con alta expresión de este gen tienen una supervivencia reducida, además, se presume que LINC01087 tiene la capacidad de actuar como una esponja de miR-130a-3p para afectar la expresión de la proteína FOXA1 y afectar la viabilidad, proliferación, migración y mimetismo vasculogénico en la línea celular de cáncer de mama BT474 (figura 15).

Específicamente, las conclusiones de este proyecto de investigación se enlistan a continuación;

- 1 El RNA largo no codificante **LINC01087** presenta una expresión variable en diferentes tipos de cáncer.
- 2 El **LINC01087** se sobre expresa en los tumores luminales en comparación con tejido normal y con los subtipos HER2+ y TNCB
- 3 Altos niveles de expresión del **LINC01087** predicen un menor tiempo de vida de las pacientes con cáncer de mama.
- 4 Los niveles de expresión del miR-130a-3p fueron significativamente más bajos en cáncer de mama comparado con el tejido normal, mientras que FOXA1 mostró altos niveles de expresión en el subtipo luminal comparado con tejido normal, HER2 y TNCB.
- 5 El silenciamiento de la expresión del LINC01087 demostró una disminución en la viabilidad celular, así como una reducción de la capacidad proliferativa y

migratoria. Adicionalmente, se comprobó una disminución en la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos.

- 6 Finalmente, se comprobó que el eje de correulación propuesto LINC01087/miR-130a-3p/ FOXA1 puede estar impactando en los niveles de progresión tumoral en cáncer de mama.

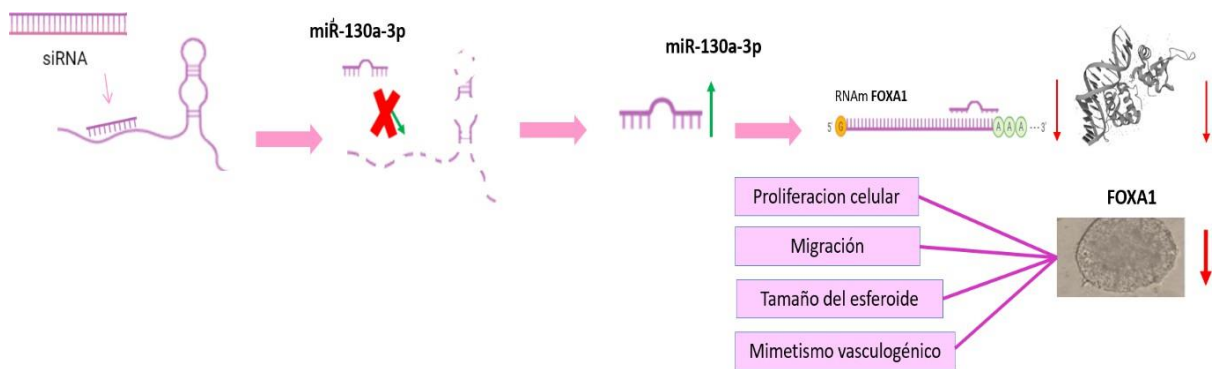


Figura 15. Mecanismo de acción propuesto para el LINC01087 en cáncer de mama. El LINC01087 se encuentra sobre expresado en los cultivos crecidos en 3D, al disminuir esta expresión por medio de RNAi, se interrumpe el mecanismo de secuestro del miR-130a-3p, por lo que este ejerce su función de regulador a nivel postranscripcional interviniendo en la síntesis de la proteína FOXA1, la cual es la encargada de regular algunos Hallmarks del cáncer de mama.

## **X. Perspectivas**

En este proyecto de investigación se empleó un modelo de cultivo celular en 2D y 3D de células de cáncer de mama BT-474, posteriormente identificamos cambios en la expresión del lncRNA (LINC01087), miRNA (miR-130a-3p) y proteína (FOXA1) comparación con las condiciones 2D. Encontramos que silenciar a LINC01087 y mediante el eje propuesto se logró reducir la proliferación celular, la capacidad migratoria y el mimetismo vasculogénico. En consecuencia, este descubrimiento abre una posibilidad para regular el desarrollo del cáncer, sin embargo, aún quedan incógnitas que despejar. La perspectiva inmediata del proyecto es:

1. Corroborar la interacción LINC01087/miR-130a-3p/ FOXA1 mediante ensayos de luciferasa
2. Desarrollar una nanopartícula acoplada al lncRNA-LINC01087 que tenga como blanco alguna molécula específica para pacientes con cáncer de mama luminal B, como puede ser la proteína FOXA1.
3. Llevar a cabo los mismos experimentos realizados en este proyecto, pero ahora en un modelo biológico in vivo, con la finalidad de acercarnos mas a lo que ocurren en un tumor in vivo.

## BIBLIOGRAFIA

Alépée, N. (2014) 'State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology', *ALTEX*, pp. 441–477. Available at: <https://doi.org/10.14573/altex.1406111>.

Amin, A.R.M.R. *et al.* (2015) 'Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds', *Seminars in Cancer Biology*, 35, pp. S55–S77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.005>.

Batista, P.J. and Chang, H.Y. (2013) 'Long Noncoding RNAs: Cellular Address Codes in Development and Disease', *Cell*, 152(6), pp. 1298–1307. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.012>.

Boghaert, E.R. *et al.* (2017) 'The Volume of Three-Dimensional Cultures of Cancer Cells In Vitro Influences Transcriptional Profile Differences and Similarities with Monolayer Cultures and Xenografted Tumors', *Neoplasia*, 19(9), pp. 695–706. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.06.004>.

Bouz Mkabaah, L. *et al.* (2023) 'Assessing the Role of MicroRNAs in Predicting Breast Cancer Recurrence—A Systematic Review', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), p. 7115. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24087115>.

Cedro-Tanda, A. *et al.* (2020) 'A lncRNA landscape in breast cancer reveals a potential role for AC009283.1 in proliferation and apoptosis in HER2-enriched subtype', *Scientific Reports*, 10(1), p. 13146. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69905-z>.

Chandramouly, G. *et al.* (2007) 'The control of tissue architecture over nuclear organization is crucial for epithelial cell fate', *Journal of Cell Science*, 120(9), pp. 1596–1606. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.03439>.

Chen, W. *et al.* (2022) 'LINC01087 indicates a poor prognosis of glioma patients with preoperative MRI', *Functional & Integrative Genomics*, 22(1), pp. 55–64. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10142-021-00812-w>.

Chen, Z. *et al.* (2017) 'Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma', *PLOS ONE*. Edited by W.B. Coleman, 12(9), p. e0182397. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182397>.

Chi, Y. *et al.* (2019) 'Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers', *Cells*, 8(9), p. 1015. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8091015>.

Classon, M. and Harlow, E. (2002) 'The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer', *Nature Reviews Cancer*, 2(12), pp. 910–917. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc950>.

- Cox, T.R. and Emler, J.T. (2011) 'Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer', *Disease Models & Mechanisms*, 4(2), pp. 165–178. Available at: <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>.
- Cserni, G. (2020) 'Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time', *Pathologica*, 112(01), pp. 25–41. Available at: <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>.
- Dahariya, S. *et al.* (2019) 'Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells', *Molecular Immunology*, 112, pp. 82–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>.
- Dai, X. *et al.* (2017) 'Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping', *Journal of Cancer*, 8(16), pp. 3131–3141. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.
- De Palma, F.D.E. *et al.* (2020) 'The abundance of the long intergenic non-coding RNA 01087 differentiates between luminal and triple-negative breast cancers and predicts patient outcome', *Pharmacological Research*, 161, p. 105249. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105249>.
- De Palma, F.D.E. *et al.* (2022) 'Systematic Investigation of the Diagnostic and Prognostic Impact of LINC01087 in Human Cancers', *Cancers*, 14(23), p. 5980. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14235980>.
- Eliyatkin, N. *et al.* (2015) 'Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way', *Journal of Breast Health*, 11(2), pp. 59–66. Available at: <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>.
- Fantozzi, A. *et al.* (2014) 'VEGF-Mediated Angiogenesis Links EMT-Induced Cancer Stemness to Tumor Initiation', *Cancer Research*, 74(5), pp. 1566–1575. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1641>.
- Ferreira, L.P., Gaspar, V.M. and Mano, J.F. (2018) 'Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects', *Acta Biomaterialia*, 75, pp. 11–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034>.
- Hamburger, A.W. and Salmon, S.E. (1977) 'Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells', *Science*, 197(4302), pp. 461–463. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.560061>.
- Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57–70. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hon, C.-C. *et al.* (2017) 'MErcer', *Nature*, 543(7644), pp. 199–204. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21374>.

Hu, Y., Dong, Z. and Liu, K. (2024) 'Unraveling the complexity of STAT3 in cancer: molecular understanding and drug discovery', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02949-5>.

Hussen, B.M. *et al.* (2021) 'MicroRNA: A signature for cancer progression', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, p. 111528. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111528>.

Juarez-Moreno, K. *et al.* (2022) 'Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles', *Toxicology in Vitro*, 85, p. 105461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105461>.

Jubelin, C. *et al.* (2022) 'Three-dimensional in vitro culture models in oncology research', *Cell & Bioscience*, 12(1), p. 155. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>.

Kapałczyńska, M. *et al.* (2016) '2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures', *Archives of Medical Science* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.

Karlsson, O. and Baccarelli, A.A. (2016) 'Environmental Health and Long Non-coding RNAs', *Current Environmental Health Reports*, 3(3), pp. 178–187. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0092-1>.

Kenny, P.A. *et al.* (2007) 'The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression', *Molecular Oncology*, 1(1), pp. 84–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>.

Khalil, A.M. *et al.* (2009) 'Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), pp. 11667–11672. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>.

Kong, X. *et al.* (2018) 'MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(2), pp. 486–493. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.018>.

Le, L.T.T. and Nhu, C.X.T. (2023) 'The Role of Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), p. 13805. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241813805>.

Lin, R. and Chang, H. (2008) 'Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research', *Biotechnology Journal*, 3(9–10), pp. 1172–1184. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>.

- Liu, Q. *et al.* (2016) 'The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(9), pp. 1761–1769. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12851>.
- Liu, Y. *et al.* (2021) 'Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer', *Molecular Therapy - Oncolytics*, 23, pp. 458–476. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.005>.
- Lopez, J.I. *et al.* (2011) 'In situ force mapping of mammary gland transformation', *Integrative Biology*, 3(9), pp. 910–921. Available at: <https://doi.org/10.1039/c1ib00043h>.
- Luo, Q. *et al.* (2020) 'Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications', *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), p. 19. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00858-6>.
- Ma, L., Bajic, V.B. and Zhang, Z. (2013) 'On the classification of long non-coding RNAs', *RNA Biology*, 10(6), pp. 924–933. Available at: <https://doi.org/10.4161/rna.24604>.
- Macias, H. and Hinck, L. (2012) 'Mammary gland development', *WIREs Developmental Biology*, 1(4), pp. 533–557. Available at: <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.
- Maniotis, A.J. *et al.* (1999) 'Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry', *The American Journal of Pathology*, 155(3), pp. 739–752. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5).
- Matouk, I.J. *et al.* (2007) 'The H19 Non-Coding RNA Is Essential for Human Tumor Growth', *PLoS ONE*. Edited by S. Wölfel, 2(9), p. e845. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000845>.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E. and Mattick, J.S. (2009) 'lincRNA', *Nature Reviews Genetics*, 10(3), pp. 155–159. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2521>.
- Metovic, J. *et al.* (2022) 'FOXA1 in Breast Cancer: A Luminal Marker with Promising Prognostic and Predictive Impact', *Cancers*, 14(19), p. 4699. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14194699>.
- Milczarek, M. (2020) 'The Premature Senescence in Breast Cancer Treatment Strategy', *Cancers*, 12(7), p. 1815. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12071815>.
- Mondal, P. and Meeran, S.M. (2020) 'Long non-coding RNAs in breast cancer metastasis', *Non-coding RNA Research*, 5(4), pp. 208–218. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2020.11.004>.
- Moradi-Gharibvand, N. and Hashemibeni, B. (2023) 'The Effect of Stem Cells and Vascular Endothelial Growth Factor on Cancer Angiogenesis', *Advanced Biomedical Research*, 12(1). Available at: [https://doi.org/10.4103/abr.abr\\_378\\_21](https://doi.org/10.4103/abr.abr_378_21).

Mouw, J.K. *et al.* (2014) 'Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression', *Nature Medicine*, 20(4), pp. 360–367. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3497>.

Nik-Zainal, S. *et al.* (2016) 'Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences', *Nature*, 534(7605), pp. 47–54. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature17676>.

Nuñez-Olvera, S.I. *et al.* (2022) 'Breast Cancer Cells Reprogram the Oncogenic lncRNAs/mRNAs Coexpression Networks in Three-Dimensional Microenvironment', *Cells*, 11(21), p. 3458. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11213458>.

Patraquim, P. *et al.* (2022) 'Translation and natural selection of micropeptides from long non-canonical RNAs', *Nature Communications*, 13(1), p. 6515. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34094-y>.

Perou, C.M. *et al.* (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', *Nature*, 406(6797), pp. 747–752. Available at: <https://doi.org/10.1038/35021093>.

Poodineh, J. *et al.* (2020) 'MiR-130a-3p blocks Wnt signaling cascade in the triple-negative breast cancer by targeting the key players at multiple points', *Heliyon*, 6(11), p. e05434. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05434>.

Prat, A. *et al.* (2010) 'Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer', *Breast Cancer Research*, 12(5), p. R68. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr2635>.

Roy, P. and Saikia, B. (2016) 'Cancer and cure: A critical analysis', *Indian Journal of Cancer*, 53(3), p. 441. Available at: <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>.

Salinas-Vera, Y.M. *et al.* (2022) 'Three-Dimensional Organotypic Cultures Reshape the microRNAs Transcriptional Program in Breast Cancer Cells', *Cancers*, 14(10), p. 2490. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14102490>.

Saman, H. *et al.* (2020) 'Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches', *Cancers*, 12(5), p. 1172. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12051172>.

Santini, M. (2000) 'Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 36(2–3), pp. 75–87. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(00\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(00)00078-0).

Saraswathibhatla, A., Indana, D. and Chaudhuri, O. (2023) 'Cell–extracellular matrix mechanotransduction in 3D', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(7), pp. 495–516. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00583-1>.

Sharma, A., Boise, L. and Shanmugam, M. (2019) 'Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death', *Cancers*, 11(8), p. 1144. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11081144>.

She, J.-K. *et al.* (2020) 'LINC01087 is Highly Expressed in Breast Cancer and Regulates the Malignant Behavior of Cancer Cells Through miR-335-5p/Rock1', *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, pp. 9771–9783. Available at: <https://doi.org/10.2147/OTT.S255994>.

Shen, H. *et al.* (2021) 'Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture and Future Development', *Micromachines*, 12(1), p. 96. Available at: <https://doi.org/10.3390/mi12010096>.

Siegel, R.L. *et al.* (2023) 'Cancer statistics, 2023', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), pp. 17–48. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.

Sparber, P. *et al.* (2019) 'The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of hereditary diseases', *BMC Medical Genomics*, 12(S2), p. 42. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0487-6>.

Su, Y. *et al.* (2021) 'FOXA1 promotes prostate cancer angiogenesis by inducing multiple pro-angiogenic factors expression', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(11), pp. 3225–3243. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03730-3>.

Thomas, P.A. (ed.) (2011) *Breast Cancer and its Precursor Lesions: Making Sense and Making It Early*. Totowa, NJ: Humana Press. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-154-7>.

Tripathi, R. *et al.* (2020) 'Unravelling the role of long non-coding RNA - LINC01087 in breast cancer', *Non-coding RNA Research*, 5(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2019.12.002>.

Tsang, J.Y.S. and Tse, G.M. (2020) 'Molecular Classification of Breast Cancer', *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), pp. 27–35. Available at: <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000232>.

Veganzones-de-Castro, S. *et al.* (2012) 'p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up', *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 104(3), pp. 111–117. Available at: <https://doi.org/10.4321/S1130-01082012000300002>.

Vidi, P.-A., Bissell, M.J. and Lelièvre, S.A. (2012) 'Three-Dimensional Culture of Human Breast Epithelial Cells: The How and the Why', in S.H. Randell and M.L. Fulcher (eds) *Epithelial Cell Culture Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 193–219. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_13).

Wang, J. *et al.* (2010) 'CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer', *Nucleic Acids Research*, 38(16), pp. 5366–5383. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq285>.

Wang, P. *et al.* (2014) 'The STAT3-Binding Long Noncoding RNA Inc-DC Controls Human Dendritic Cell Differentiation', *Science*, 344(6181), pp. 310–313. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1251456>.

Yang, F. *et al.* (2018) 'An androgen receptor negatively induced long non-coding RNA ARNILA binding to miR-204 promotes the invasion and metastasis of triple-negative breast cancer', *Cell Death & Differentiation*, 25(12), pp. 2209–2220. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0123-6>.

Yin, Y. *et al.* (2022) 'LINC01087 Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Thyroid Cancer Cells by Upregulating PPM1E', *Journal of Oncology*. Edited by W. long Zhong, 2022, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/7787378>.

Yip, K.W. and Reed, J.C. (2008) 'Bcl-2 family proteins and cancer', *Oncogene*, 27(50), pp. 6398–6406. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.307>.

Zhang, J. *et al.* (2021) 'Novel lncRNA Panel as for Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Based on ceRNA Network Mechanism', *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. Edited by T. Huang, 2021, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/8020879>.

Zhang, W., Guan, X. and Tang, J. (2021) 'The long non-coding RNA landscape in triple-negative breast cancer', *Cell Proliferation*, 54(2), p. e12966. Available at: <https://doi.org/10.1111/cpr.12966>.

Zhang, X. *et al.* (2019) 'Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), p. 5573. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>.

Zhao, G. *et al.* (2013) 'Genome-wide identification of cancer-related polyadenylated and non-polyadenylated RNAs in human breast and lung cell lines', *Science China Life Sciences*, 56(6), pp. 503–512. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4485-1>.

Zhou, Y., Li, S. and Yoshida, S. (2022) 'Editorial: Non-coding RNAs in ophthalmic diseases', *Frontiers in Genetics*, 13, p. 1055701. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1055701>.