



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS RNAs NO CODIFICANTES LARGOS, ENTRE
CULTIVOS EN MONOCAPA Y ESFEROIDES DE MCF-7**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PACHECO MARIN ROSARIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: VILMA ARACELÍ MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA, INMEGEN

COMITÉ TUTOR: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS RNAs NO CODIFICANTES LARGOS, ENTRE
CULTIVOS EN MONOCAPA Y ESFEROIDES DE MCF-7**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PACHECO MARIN ROSARIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: VILMA ARACELÍ MALDONADO LAGUNAS

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA, INMEGEN

COMITÉ TUTOR: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de noviembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **PACHECO MARÍN ROSARIO** con número de cuenta **98536515** con la tesis titulada **"EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS RNAs NO CODIFICANTES LARGOS, ENTRE CULTIVOS EN MONOCAPA Y ESFEROIDES DE MCF-7"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS**:

Presidente: DR. JUAN MIRANDA RIOS
Vocal: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
Secretario: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 31 de marzo de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) por haberme brindado todo lo necesario para llevar a cabo de manera correcta y con calidad mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido a través de la beca con número de CVU 225990 y que fue de gran ayuda para poder solventar mis gastos durante todo el doctorado.

Agradezco de manera especial a mi Tutora la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por la confianza que deposito en mí, por su apoyo y asesorías constantes. Por su comprensión durante todo este tiempo, entre sus virtudes el estar siempre abierta al diálogo y con quien puede expresar de manera libre mis inquietudes.

Agradezco enormemente a mi comité Tutorial conformado por el Dr. Gonzalo Castillo Rojas y Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta por sus valiosas aportaciones y comentarios a lo largo del proyecto. Por su tiempo dado que siempre mostraron una disposición ante mis solicitudes.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi principal escuela la familia por apoyarme, por su confianza y libertad que me brindan a lo largo de mi vida, porque siempre están conmigo gracias a ellos he podido lograr mis objetivos. Mis hermanos, Andrés y Sergio quienes son mi ejemplo de superación, a mi cuñada Olivia por ser una hermana para mí, a mis sobrinos Ivonne, Uriel y Andy por su respecto y apoyo. A mi papa Andrés por sus consejos y sus alertas que hacen que vaya con precaución. Y en especial a mi mami Teo por su cariño y apoyo incondicional a todos ellos gracias.

A mi hermosa Ximena Vianney por su luz que brinda a mi vida, porque tuve la fortuna de que me elegiría como su mamá y quien genera la fuerza en mí para poder superar cualquier obstáculo y enfrentar mis miedos. Al cómplice de todas mis aventuras, Artur gracias por apoyarme incondicionalmente sabes que eres mi niño especial, los amo.

A cada una de las personas que de alguna forma me apoyaron y que gracias a su ayuda pude resolver situaciones durante el proyecto: Gisela, Jisela, Jose Luis, Alex, Helem, Paty, Jeny, Stephany, Valeria, Dr. Julio, Dr. Juan Miranda, Alfredo MendozaGRACIAS

A mi comité de jurado de examen Dr. Juan Miranda Ríos, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por sus valiosas y acertadas aportaciones al manuscrito.

Al personal del posgrado en ciencia biológicas (UNAM), Dr. Armando, Dra. Yolanda, Erika, Lic. Lilia Espinoza, Lilia Solís, MVZ Roció que siempre mostraron una actitud de apoyo y asesoría constante para poder llevar lo mejor posible mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

*A mi pequeña
Ximena Viannery Chirino Pacheco
Por generar en mi sentimientos que nunca
hubiera imaginado*

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE TABLAS Y CUADROS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
I. Cáncer de mama y resistencia celular	4
II. Esferoides tumorales multicelulares (MTS)	7
III. RNAs no codificantes largos (lncRNAs)	9
IV. Mecanismos de acción de los lncRNAs	10
V. Función de los lncRNAs en cáncer	13
VI. Implicaciones terapéuticas de los lncRNAs	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
ANTECEDENTES	20
MÉTODO	22
I. Cultivo de la línea celular MCF-7	22
II. Formación de esferoides	22
III. Determinación del crecimiento de los esferoides	22
IV. Histología de los esferoides	23

V. Ensayos de migración celular	23
VI. Análisis del ciclo celular	24
VII. Purificación del RNA total de células MCF-7 en monocapa y esferoides	24
VIII. Transcriptoma del RNA por secuenciación masiva	25
IX. Validación por PCR tiempo real (qPCR) de los lncRNAs y mRNAs	26
X. Consumo de oxígeno y determinación del flujo en la fosforilación oxidativa (FO)	27
RESULTADOS	29
I. Caracterización de los MTS	29
II. Habilidad de migración de las células cultivadas como MTS	30
III. Análisis del transcriptoma en MTS <i>versus</i> cultivos en monocapa	32
IV. Análisis de los RNA codificantes (mRNAs)	32
V. Los MTS de estadios tempranos en MCF-7 muestran una hiperactivación del metabolismo oxidativo mitocondrial	45
VI. Análisis del ciclo celular en células MCF-7 cultivadas en monocapa y MTS	49
VII. Análisis de los RNAs no codificantes largos (lncRNAs)	53
VIII. Validación de los lncRNAs diferencialmente expresados	56
IX. Distribución de los mRNAs y lncRNAs diferencialmente expresados por cromosoma	59
X. Análisis de la relación posicional entre los lncRNAs y sus mRNAs adyacentes	61
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS FUTURAS	82
LITERATURA CITADA	83
ANEXO	90

Artículo publicado “Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids”

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadísticas de mortalidad e incidencia de cáncer	4
Figura 2. Expresión diferencial de genes en esferoides formados por dos métodos diferentes	8
Figura 3. Número de lncRNAs reportados en humanos y ratón	10
Figura 4. Función de los lncRNAs en la remodelación de la cromatina	11
Figura 5. Función de los lncRNAs a nivel transcripcional	12
Figura 6. Función de los lncRNAs a nivel post-transcripcional	13
Figura 7. Crecimiento y caracterización de los MTS	31
Figura 8. Análisis de los mRNAs expresados diferencialmente en MTS utilizando RNAseq	35
Figura 9. Las cinco principales vías canónicas alteradas en MTS de acuerdo al promaga IPA	38
Figura 10. Hiperactivación del metabolismo oxidativo mitocondrial en MTS	47
Figure 11. Análisis del ciclo celular en MTS <i>versus</i> monocapa usando citometría de flujo	49
Figura 12. Análisis de los lncRNAs en MTS <i>versus</i> monocapa, usando RNAseq.	55
Figure 13. Validación de los lncRNAs por qRT-PCR.	57
Figure 14. Distribución de los lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados por cromosoma.	60
Figura 15. Relación posicional entre lncRNAs y sus mRNAs adyacentes en MTS	63
Figure 16. Relación posicional entre lncRNAs y sus mRNAs adyacentes en MTS usando el programa IGV.	64

ÍNDICE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1. Primers o cebadores de los lncRNAs, mRNAs y TBP (control endógeno)	28
Tabla 2. Los principales 20 mRNAs suprimidos e inducidos con mayor alteración, relacionados con cáncer de mama y metástasis.	33
Tabla 3. Las 5 principales vías canónicas (IPA) y sus genes reprimidos e inducidos en MTS	36
Tabla 4. Vías de señalización canónicas relacionadas con ciclo celular y moléculas diferencialmente expresadas (IPA)	37
Tabla 5. Tasas de consumo de oxígeno y flujo de la fosforilación oxidativa en células MCF-7 de monocapa y MTS de seis días de cultivo	48
Tabla 6. Validación por qRT-PCR de los cambios de expresión génica identificados por secuenciación masiva	58
Tabla 7. Relación entre los 63 lncRNAs y mRNA adyacentes, se incluyen las isoformas de los lncRNAs	65
Cuadro I. Nomenclatura de la formas de las moléculas, colores y relaciones presentes en las imágenes de las vías canónicas (IPA)	43
Cuadro II. Genes con sinonimo o grupo de genes presentes en las imágenes de las vías canónicas (IPA)	44

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
GLOBOCAN	Estimado, incidencia, mortalidad y prevalencia mundial de cáncer
EGFR	Factor de crecimiento epidermal
MTS	Esferoides tumorales multicelulares
IGF-1R	Factor de crecimiento semejante a insulina
ER	Receptor de estrógenos
PR	Receptor de progesterona
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
MDR1	Proteínas de resistencia a múltiples drogas 1
EMT-6	Línea celular de tumor mamario de ratón
PDMS	Polidimetilsiloxano
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
ncRNAs	RNAs no codificantes
lncRNAs	RNAs no codificantes largos
miRNA	Micro RNAs
GENCODE	Enciclopedia de elementos de DNA
TLS	Proteína de unión al RNA
CBP	Proteína de unión a CREB
CREB	Proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc (Monofosfato de adenosina cíclico)
NAT	Transcriptos antisentidos naturales
Fold-change	Veces de cambio en la expresión de un gen entre dos condiciones
EPCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
FO	Fosforilación oxidativa
IPA	Ingenuity pathway analysis (software; Análisis de vías)
SBF	Suero bovino fetal
nt	Nucleótido

RESUMEN

El establecimiento de un gradiente fisiopatológico y la organización concéntrica de células proliferantes, quiescentes y muertas características de los esferoides aumentan conforme al tamaño y dependerá de la línea celular, pero en principio el comportamiento es similar a la situación de nódulos tumorales avasculares, micrometastasis o microrregiones intercapilares de los tumores sólidos *in vivo*. Sin embargo, estudios a nivel del perfil de expresión de todo el transcriptoma en esferoides de cáncer de mama aún no se ha investigado a fondo. Por lo que, en este estudio se exploró el transcriptoma en esferoides de células de cáncer de mama durante las etapas iniciales del crecimiento, usando secuenciación masiva del RNA. Donde se identificaron varios mRNAs de membrana, implicados en uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, tales como claudina 1, claudina 4, integrinas, plexina 2, sindecanos (1 y 4), así como EPCAM y E-cadherina. Genes asociados con metástasis en cáncer de mama tales como; Claudina 1 y 4, EPCAM, E-cadherina, PMP22, MIF, PGR, S100A9, etc. Además, los esferoides disgregados presentaron un patrón de migración a diferencia de las células en monocapa. A su vez, en esta etapa del crecimiento del esferoide donde aún no hubo presencia de hipoxia, se encontró una hiperactivación paradójica del metabolismo mitocondrial oxidativo. Un gran número de RNA no codificantes (lncRNAs) fueron encontrados, algunos de ellos fueron co-regulados con genes vecinos mRNAs que estuvieron involucrados en algunos procesos celulares como fue la disfunción mitocondrial y ciclo celular, así como un grupo muy interesante de mRNAs de histonas fue co-regulado con algún lncRNA. De esta manera concluimos que la fosforilación oxidativa juega un papel importante en el metabolismo energético para las etapas iniciales de los esferoides tumorales multicelulares (MTS). Los genes mRNAs y lncRNAs expresados de manera diferencial en cultivos de esferoides

tumorales multicelulares y cultivos en monocapa de MCF-7 marcan un camino para explorar la funcionalidad de estos genes durante las etapas tempranas de formación de los MTS.

ABSTRACT

Establishing pathophysiological gradients and concentric organization of proliferating, quiescent and dead cells in the spheroids, increase as the size of the spheroid and depend on the cell line, but in principle the behavior is similar to the situation of avascular tumor nodules, or micrometastasis inter-capillary micro-regions of solid tumors *in vivo*. However, studies on genome-wide cancer cell cultures in spheroids initial stages has not been thoroughly investigated. So, in this study we explored the transcriptome of cells in spheroids breast cancer during the initial stages of growth, RNA sequencing using. We identified several mRNAs membrane, involved in cell-cell junctions and cell-extracellular matrix such as; claudin 1 claudin 4 integrins, plexin 2, syndecans (1 and 4), EPCAM and E-cadherin. Genes associated with metastasis in breast cancer such as; Claudina 1 and 4, EPCAM, E-cadherin, PMP22, MIF, PGR, S100A9, etc. Multicellular spheroids disaggregated cells exhibit a migration pattern unlike cells in monolayer. Also, at this stage of growth where spheroid still no presence of hypoxia, a paradoxical hyperactivation of mitochondrial oxidative metabolism was found. A large number of non-coding RNA (lncRNAs) were found, some of them were co-regulated mRNAs neighboring genes that were involved in some cellular processes as was the mitochondrial dysfunction and cell cycle, as well as a very interesting group of mRNAs of histones was co-regulated with a lncRNAs. Thus we conclude that oxidative phosphorylation plays an important role in energy metabolism for the initial stages of multicellular tumor spheroids (MTS). The lncRNAs and mRNAs deregulated genes between cultures in multicellular tumor spheroids and monolayer cultures of MCF -7 mark a way to explore the functionality of the genes at this stage of the MTS.

INTRODUCCIÓN

I. Cáncer de mama y resistencia celular

De acuerdo con las estadísticas reportadas por INEGI 2013 y GLOBOCAN 2012, el cáncer de mama en México y a nivel mundial sigue ocupando el primer lugar de mortalidad e incidencia (Figura 1). Seguido por el cáncer cervicouterino y colorectal en México (Figura 1) (INEGI 2013), sin embargo a nivel mundial el patrón cambia dado que el cáncer colorectal ocupa el segundo lugar seguido por el cáncer de pulmón (Figura 1) (GLOBOCAN, 2012)



Figura 1. Estadísticas de mortalidad e incidencia de cáncer. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en México y a nivel mundial (INEGI 2013, GLOBOCAN 2012).

La detección oportuna y en estadios primarios del cáncer de mama, es la clave para reducir el riesgo de fallecer por esta patología. Además, los tratamientos son menos agresivos evitando incluso perder el seno. Sin embargo, esta posibilidad de sobrevivir se ve disminuida cuando las células cancerosas se diseminan e invaden a otros órganos (Ruddon RW 2007 y FUCAM). En la actualidad los tratamientos para este tipo de cáncer van desde la cirugía, donde solamente se extirpa el tumor y parte del tejido normal que se encuentre a su alrededor, pero sin perder el seno a este tipo de cirugía se le llama mastectomía parcial. O bien la mastectomía total, donde se extirpa todo el seno que es afectado por el cáncer incluyendo en algunos casos la extracción de los ganglios linfáticos de la axila y parte de los músculos de la pared torácica (National Cancer Institute 2006, en línea).

Otro tratamiento es la quimioterapia, que consiste en utilizar medicamentos para interrumpir principalmente el crecimiento de las células cancerosas. La quimioterapia puede administrarse antes de la cirugía, con la finalidad de reducir primero el tamaño del tumor. O bien, después de la cirugía para destruir cualquier remanente de células cancerosas y además de que es un método preventivo para disminuir el riesgo de que el cáncer se vuelva a expresar (National Cancer Institute 2006, en línea). Algunos ejemplos de medicamentos administrados en este tipo de cáncer son las antraciclinas (doxorubicina), paclitaxel (Taxol), cisplatino y aproximadamente otros 45 fármacos. También se incluyen fármacos aplicados como terapia hormonal que consiste en reducir hormonas o bloquear su acción reduciendo la proliferación de las células cancerosas (American Cancer Society, 2016, en línea). En este tipo de fármacos se encuentran tamoxifeno (un antagonista del receptor de estrógenos) (Ring A y Dowsett M 2004) o el inhibidor de la enzima aromatasa (Als) que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (Miller WR y Larionov AA 2012).

La radioterapia es otro tipo de tratamiento que utiliza alta energía de rayos X y gamma, eliminando las células cancerosas. Hay dos tipos de radioterapia; la externa donde la radiación es enviada desde afuera del cuerpo utilizando una máquina o bien se utilizan sustancias como isótopos radiactivos que están selladas en un contenedor llamado implante y que son enviados a través de catéteres, agujas u otro tipo de portador a las zonas directas o cercanas al tumor a este último tipo de radiación se le conoce también como braquiterapia (National Cancer Institute 2006 y American Cancer Society 2016, en línea)

Finalmente el desarrollo de tratamientos dirigidos para dianas biológicas específicas de células cancerosas como por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico humano receptor 2 (HER2), tirosina cinasa, cinasas dependientes de ciclinas, VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular), etc.,. La terapia dirigida por su especificidad puede tener menos efectos secundarios que los otros tipos de tratamiento contra el cáncer.

Sin embargo, la resistencia de las células cancerosas a los diversos tratamientos sigue siendo la razón principal del fracaso, tanto para el cáncer de mama como para otros tipos. Dentro de los múltiples mecanismos de resistencia se incluye la inhibición de la apoptosis, incremento de la proliferación, expulsión del fármaco, etc. (Jones VS et al., 2016).

A nivel de apoptosis por ejemplo la proteína PAK2 (familia de serina/treonina cinasa) puede unirse y fosforilar a la proteína caspasa-7 inhibiendo su función y como consecuencia el proceso de apoptosis se ve disminuido (Li X., et. al., 2011). Por otro lado, la aberrante expresión de varios receptores de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidermal (EGFR), receptor del factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-1R), receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) favorecen la resistencia al estimular la proliferación de la células tumorales (Li X., et. al., 2011). También, la familia de transportadores ABC de los cuales al menos 12 son reconocidos por ser transportadores de fármacos contribuyen con la resistencia celular, entre estas proteínas se encuentran la P-glicoproteína (Pgp), la proteína asociada a resistencia a multidroga1 (MRP1) y ABC subfamilia G miembro 2 (ABCG2) o también conocida como proteína de resistencia en cáncer de mama. Estas proteínas son de gran importancia dado que se encuentran en altos niveles de expresión en pacientes con cáncer, lo que resulta en un aumento del eflujo del fármaco incluso antes que llegue al sitio diana (Ling V 1997). También se ha observado que el incremento en la actividad de enzimas involucradas en la reparación del DNA puede contribuir en la resistencia celular, en conjunto todas estas alteraciones contribuyen con un mal pronóstico para el paciente (Li X., et. al., 2011, Kuo MT 2007 y Ling V 1997).

Otro factor importante que promueva la resistencia a antineoplásicos por las células cancerosas es el mismo microambiente del tumor y/o distribución del fármaco dentro de éste. El flujo sanguíneo en los tumores es frecuentemente irregular y la distancia intercapilar puede ser relativamente extensa comparada con el tejido normal. En consecuencia, la penetración del fármaco en el tejido del tumor es

más limitada que en el tejido normal. Por lo tanto, los factores que influyen en la distribución del antineoplásico en el tumor son; la repartición del fármaco por parte del sistema vascular, la tasa de difusión a través del tejido, el metabolismo del antineoplásico y la unión a los componentes del tejido (Tong D et al., 2002 y Kyle AH et al., 2007).

II. Esferoides tumorales multicelulares (MTS)

Por lo tanto, el modelo de evaluación de los sistemas de distribución de antineoplásicos en esferoides ha arrojado grandes conocimientos al respecto. Los cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) son un modelo funcional *in vitro* de los tumores sólidos, dada su estructura general los MTS mimetizan las etapas iniciales de los micro tumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización. Los esferoides presentan una estructura característica de un tumor sólido distinguiéndose en ellos tres capas celulares, una capa externa formada principalmente por células proliferativas, una zona intermedia formado por células quiescentes y un centro apoptótico y/o necrótico (Gallardo PJ et al., 2006 y Trédan O et al., 2007). Dichas capas celulares se verán influenciadas por el tamaño del esferoide dado que cuando las células centrales de los esferoides son privadas de oxígeno y glucosa la muerte celular y necrosis se produce. De acuerdo con esto células apoptóticas en el centro del esferoide se han observado cuando estos alcanzan un tamaño de 500 μm aproximadamente, mientras que la apoptosis no es detectada en esferoides menor de 400 μm (Dufau I et al., 2012).

Los MTS han sido de gran utilidad en el estudio de la biología tumoral incluyendo migración, invasión y angiogénesis (Zhou Y et al., 2013, Trédan O et al., 2007, Gallardo PJ et al., 2006). Además, la resistencia a diferentes antineoplásicos en los MTS es similar a la de un tumor sólido y ahora es ampliamente aceptado que los MTS pueden resolver algunos de los problemas de los cultivos en monocapa los cuales son esencialmente homogéneos en cuanto distribución, estado nutricional, tensión de oxígeno, estado proliferativo, eliminación de productos de desecho, etc. Los MTS son utilizados en pruebas fármaco toxicológicas y en la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer

como un paso previo a su aplicación en los tumores sólidos *in vivo* (Hirschhaeuser F et al., 2010, Trédan O et al., 2007 y Gallardo PJ et al., 2006)

Sin embargo, existen pocos estudios que contribuyen al análisis de expresión de genes en MTS. Por citar algunos tenemos el de Zhou Y et al., (2013), quienes evaluaron la actividad respiratoria en esferoides de la línea celular MCF-7 formados con dos métodos distintos de cultivo: el de gota colgante y en placas con una base del polímero llamado polidimetilsiloxano (PDMS). En donde, los esferoides formados con placas de PDMS presentaron una mayor actividad respiratoria, además de una alta expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa y senescencia celular en comparación con los MTS formados con el método de la gota colgante. Este análisis refleja que a pesar de que los esferoides evaluados presentaban un similar tamaño (100µm) y morfología existe una gran variabilidad a nivel bioquímico influenciado por el microambiente. Los genes analizados en este estudio se muestran en la figura 2.

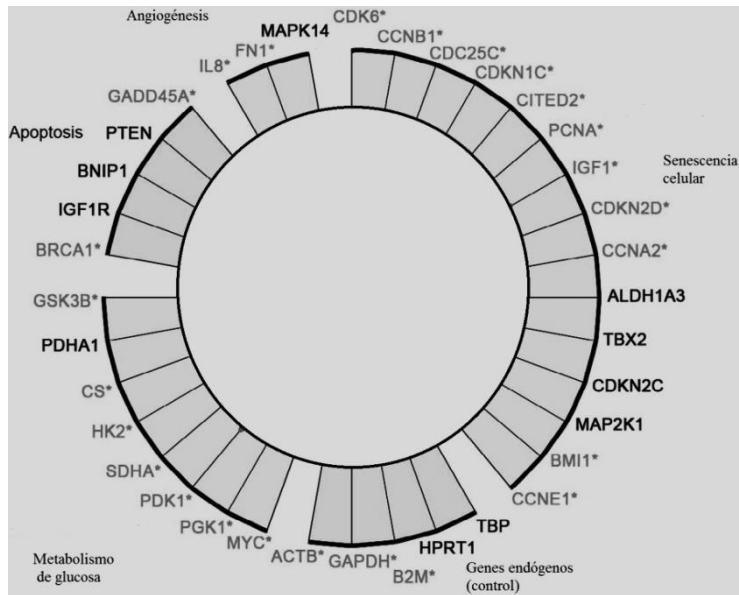


Figura 2. Expresión diferencial de genes en esferoides formados por dos métodos diferentes. Genes involucrados en senescencia, angiogénesis, apoptosis y metabolismo de glucosa. Genes con cambio significativo en letras de color claro y con un asterisco (Modificado de Zhou Y et al., 2013).

En otro estudio se evaluó la expresión de genes entre MTS de la línea celular de tumor mamario de ratón (EMT-6) y cultivo en monocapa, en donde encontraron genes relacionados con la reparación del DNA. En particular el gen PMS2 (Mismatch repair endonuclease) quien presentó una expresión baja en esferoides en comparación con células en monocapa, este gen fue relacionado con la resistencia celular producida por agentes alquilantes y a otros agentes que dañan al DNA. Al parecer el mecanismo fue a través de una disminución en la reparación de errores durante la replicación del DNA en esferoides (Francia G et al., 2004).

III. RNAs no codificantes largos (lncRNAs)

Un tema reciente de estudio es la participación de los RNAs no codificantes (ncRNAs) en patologías como el cáncer, la resistencia a antineoplásicos, entre otros procesos celulares (Doyle LA et al., 1996, Tsang WP et al., 2007 y Ma J et al., 2010). Inicialmente se utilizó el término RNA no codificante principalmente para describir RNAs poliadenilados que son transcritos principalmente por la RNA polimerasa II, al igual que el RNA que codifica para proteínas (mRNA), pero que generalmente carecen de un marco de lectura abierta (Barcieszewski Jan y Volker A Erdmann 2003 y Liu J et al., 2006). Sin embargo, este término se ha ampliado y ahora se puede aplicar para cualquier transcripción de RNA que no muestre capacidad de codificación a proteína. Los RNAs no codificantes (ncRNAs) surgen principalmente de elementos transponibles en el genoma, regiones intergénicas, la cadena antisentido, empalme alternativo y regiones intrónicas principalmente (Barcieszewski Jan y Volker A Erdmann 2003). Son procesados por empalme, pueden contener o no en el extremo 3' un tallo de poliadenilación poli (A+) o poli (A-), o bien pueden tener ambas formas poli A+ y A- considerando a éstos últimos como bimórficos (Zhao G et al., 2013). Sorprendentemente, muchos de estos ncRNAs no son necesariamente secuencias cortas (entre 18 a 200 nucleótidos), por el contrario pueden medir más de 200 nucleótidos considerados estos últimos RNAs no codificantes largos (lncRNAs). De acuerdo a la base de datos del proyecto GENCODE versión 23 (<http://www.encodegenes.org/>) se

reportan 15,931 lncRNAs en humanos una proporción que casi alcanza al número de genes codificantes con 19,797. En ratón se reporta un número menor de RNAs no codificantes con 8,3459 (Figura 3).

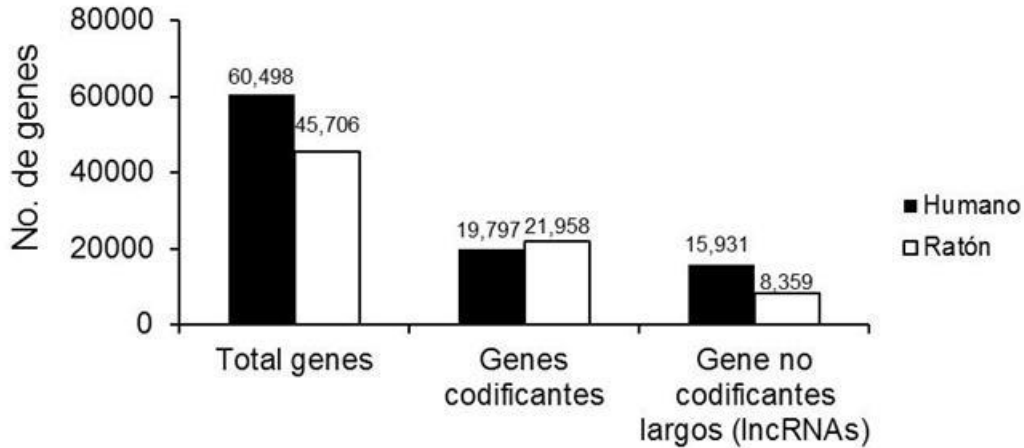


Figura 3. Número de lncRNAs reportados en humanos y ratón. Base GENCODE marzo 2015

IV. Mecanismos de acción de los lncRNAs.

Los lncRNAs se encuentran fuertemente regulados, dado que muestran patrones espaciales y temporales específicos de expresión lo que sugiere que tienen funciones biológicas específicas. Los lncRNAs pueden interactuar directamente con el DNA, RNA y/o proteínas, involucrándolos en la regulación de genes a nivel de compensación de dosis cromosómica, impronta génica, regulación transcripcional, traducción, regulación pos-transcripcional, empalme, regulación epigenética, etc., pudiendo así controlar el ciclo celular, diferenciación celular, migración, apoptosis, entre otros procesos celulares (Luo G et al., 2015, Ponting CP et al., 2009 y Mercer TR et al., 2009). A continuación se muestran algunos mecanismos de como los lncRNAs pueden regular la expresión de genes codificantes.

Remodelación de la cromatina. Por ejemplo, el lncRNA HOTAIR se une al complejo PCR2 y lo recluta al locus HOXD donde trimetilan a la histona H3 en la lisina 27 (me3K27), induciendo así la formación de heterocromatina y como consecuencia de ello la expresión del gen HOXD es reprimida

(Zhang J et al., 2014 y Mercer TR et al., 2009). Se ha demostrado que el complejo PRC2 se une al extremo 5' de HOTAIR, mientras que el extremo 3' se une al complejo represor LSD1/CoREST/REST. El complejo PRC2 tiene actividad de metiltransferasa de histonas y el complejo supresor LSD1/CoREST/REST en donde la proteína LSD1 tiene actividad de desmetilación y reconoce marcas H3K4Me3, por su parte CoREST y REDT son corepresores transcripcionales (Wang KC y Chang HY 2011, Wapinski O y Chang HY 2011 y Tsai MC et al., 2010). Por lo que HOTAIR no solo coordina la metilación de histonas H3K27 si no también la desmetilación para el silenciamiento de genes epigenético (Tsai MC et al., 2010). El mecanismo por el cual HOTAIR suprime la expresión de genes es semejante en los lncRNAs Kcnqot1 y Xist/RepA para los dominios Kcnq1 y cromosoma X respectivamente dado que estos lncRNAs también se unen al complejo polycomb PRC2 (Mercer TR et al., 2009) (Figura 4).

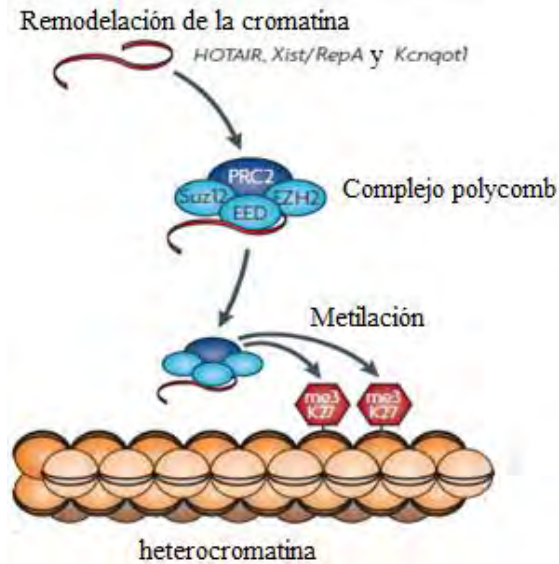


Figura 4. Función de los lncRNAs en la remodelación de la cromatina (Mercer TR et al., 2009)

A nivel transcripcional. Por ejemplo el lncRNA pncRNA ciclina D1 (ncRNA asociado a promotor) puede reprimir la expresión del gen ciclina D1, dado que este ncRNA se une específicamente a la proteína de unión al RNA TLS (translocación del liposarcoma) y ejerce la represión transcripcional a través de la inhibición de la histona acetiltransferasa (HAT). Se sugiere que dicha represión está dada por una modulación e inhibición de las proteínas tales como CBP y p300 que tiene la función de acetiltransferasa de histonas (Kurokawa R 2011 y Mercer TR et al., 2009) (Figura 5).

Regulación transcripcional

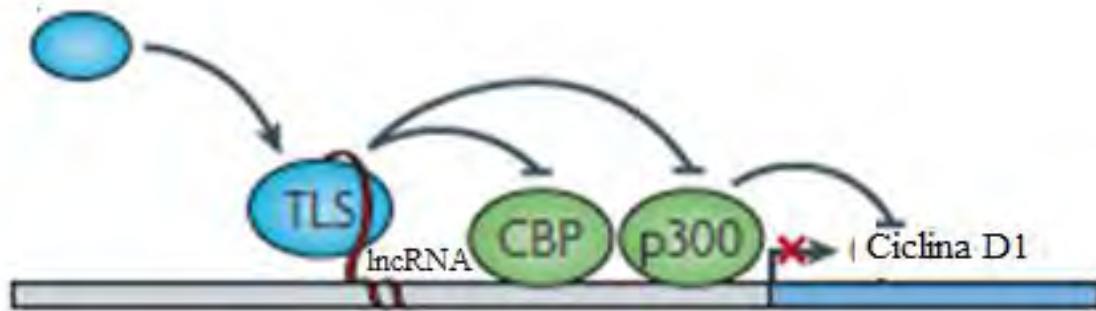


Figura 5. Función de los lncRNAs a nivel transcripcional. El gen ciclina D1 es suprimido por un ncRNAs (Mercer TR et al., 2009).

A nivel pos-transcripcional. Un ncRNA de la clase NAT (natural transcripciones antisentido) llamado Zeb2NAT puede proteger del espliceosoma a un sitio de empalme en el mRNA del gen Zeb2 (Zing finger E-box Binding homeobox 2). Dicho intrón es necesario para el reconocimiento de la maquinaria de traducción y además contiene una región IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), por lo que la retención de dicho intrón favorece la eficaz traducción y expresión del gen Zeb2 (Mercer TR et al., 2009, Beltran M et al., 2008 y www.lncrnadb.org) (Figura 6).

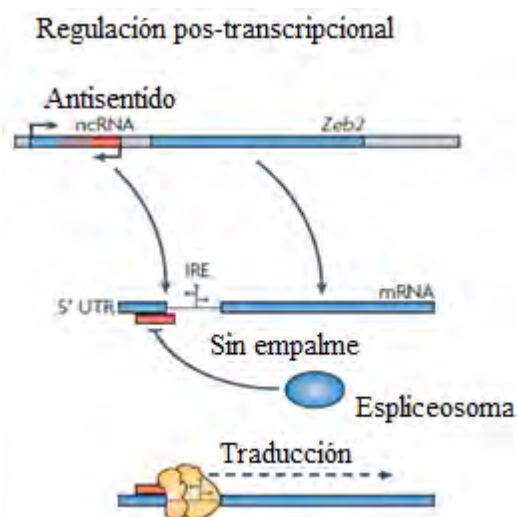


Figura 6. Función de los lncRNAs a nivel pos-transcripcional. La expresión del gen *Zeb2* es favorecida por un lncRNA antisentido (Mercer TR et al., 2009).

V. Función de los lncRNAs en cáncer.

Algunos lncRNAs pueden regular a genes codificantes (mRNAs) cercanos, incluso si se encuentran a una distancia de hasta 10kb convirtiéndolos en candidatos atractivos para su estudio (Ponting CP et al., 2009). Los lncRNAs son regulados durante el desarrollo y en respuesta a diversas señales, se expresan en tumores sólidos y leucemias, varios de estos lncRNAs regulan procesos involucrados en cáncer, inclusive en la resistencia a antineoplásicos, mostrando así una expresión específica entre células cancerosas y células normales, además su expresión varía de acuerdo al grado del tumor (Tsai MC et al., 2011). Por lo que se presume que los lncRNAs ejercen un papel funcional en el cáncer, a través de diversos mecanismos biológicos y en diferentes etapas del proceso tumorigénico. Por ejemplo el gen HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) un lncRNA de 2,2 kb, que juega un papel importante en varios tipos de cáncer incluyendo el de mama, colón, pulmón, hígado, etc., (Chen et al., 2013 y Chen et al., 2016). Regularmente los niveles de expresión de HOTAIR se encuentran elevados en tejidos cancerosos en comparación con el tejido no canceroso, por ejemplo una elevada expresión de HOTAIR se observó en cáncer de mama de estadios primarios y metastásicos. Encontrando que

cuando se induce la disminución de dicho gen también se observa una reducida capacidad de invasividad de las células y una elevada expresión de las proteínas del complejo represivo polycomb (PRC2) (Wang KC y Chang HY 2011). Algunos genes inducidos por HOTAIR son reguladores positivos de metástasis tales como ABL2, SNAIL y lamina (Gupta RA et al., 2010). Además, los altos niveles de expresión de HOTAIR se han observado en tejidos de cáncer de mama resistentes a tamoxifeno, a su vez HOTAIR contribuye con un incremento en el crecimiento celular y con un incremento en los niveles de la proteína ER (receptor de estrógeno), lo que sugiere que el potencial de HOTAIR está en aumentar las funciones transcripcionales de dicho receptor (Xue X et al., 2015).

Por otro lado, el lncRNA MALAT-1 (metástasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) de 7,5 kb de longitud que se asocia a varios tipos de cáncer incluyendo el de mama (Chen D et al., 2013, Chen et al., 2016), en donde se observó una alta expresión de este lncRNA en pacientes tratados con tamoxifeno en comparación con los no tratados. Además, se ha reportado que MALAT-1 regula el empalme alternativo a través de su interacción con la familia de fosfoproteínas nucleares ricas en serina/arginina (SR), dichas proteínas están involucradas en la maquinaria de empalme. Debido a que la familia de proteínas SR pueden afectar los patrones de empalme alternativo de muchos pre-mRNAs (precursores del mRNA), la actividad de estas proteínas debe estar bien regulada. Pequeños cambios en la concentración de proteínas (SR) o en el estado de fosforilación puede alterar el frágil equilibrio que controla la variabilidad del mRNA entre diferentes células y tipos de tejidos. Por lo que se ha sugerido que MALAT-1 actúa como un regulador al modular la actividad de proteínas SR (Wapinski O y Chang HY 2011).

Otro lncRNA llamado MEG3 (maternally expressed 3) es considerado un gen supresor de tumores, dado que la expresión de MEG3 en líneas celulares de cáncer promueve la supresión del crecimiento celular. La expresión de MEG3 se relacionó con una alta expresión de la proteína p53 que conlleva a su vez a una activación en la expresión de blancos moleculares río abajo de esta proteína. En ensayos

de formación de colonias y crecimiento MEG3 mostró una gran capacidad para inhibir la proliferación de varias líneas celulares de carcinoma entre ellos el de carcinoma cervical (HeLa), adenocarcinoma de mama (MCF-7), neuroglioma (H4) jugando un papel de gran importancia en la supresión del crecimiento celular (Zhang X et al., 2003).

Finalmente, un lncRNAs llamado CUDR (cancer up-regulated drug resistant) de 2.2 kb se relacionó con la resistencia a antineoplásicos en células de carcinoma escamoso. Al parecer este lncRNA induce la resistencia a antineoplásicos a través de la regulación de genes que participan en la vía apoptótica, dado que los altos niveles de expresión de este lncRNA se asociaron con una disminución en la expresión de la proteína caspasa tipo 3 (Tsang WP et al., 2007).

VI. Implicaciones terapéuticas de los lncRNAs.

Teranóstica (“theranostic”) es un término acuñado originalmente para describir un sistema que combina el diagnóstico y tratamiento con el objetivo de proporcionar las herramientas necesarias para la medicina personalizada. Encontrando a los ncRNAs como atractivas moléculas en la teranóstica del cáncer (Redis RS et al., 2011). El descubrimiento de estos lncRNAs y el hecho de conocer las funciones y mecanismo de varios de ellos, e incluso el conocer las proteínas que están implicadas en su biogénesis o actividad, los han convertido en un blanco para nuevos enfoques terapéuticos. Por ejemplo se están utilizando en la actualidad como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer y predicción de respuesta a la quimioterapia (Esteller M 2011 y Yeung ML y Jeang KT 2011).

Algunos ncRNAs pueden ser detectados en tejidos obtenidos por biopsias o resecciones quirúrgicas, o bien en la sangre, orina de pacientes con cáncer (Rönnau CG et al., 2014). Por ejemplo, el lncRNA PCA3 (Antígeno de cáncer de próstata 3) se encuentra en altos niveles de expresión en cáncer de próstata, si bien la función biológica de PCA3 no es del todo clara, su utilidad como un biomarcador en la prueba diagnóstica para la detección de cáncer de próstata es actualmente utilizada. Este lncRNA es detectable en muestras de orina de pacientes con cáncer de próstata, que contienen

células de dicho cáncer y que son eliminadas a través de la uretra. La prueba de PCA3 representa la más efectiva traducción clínica donde un gen ncRNAs asociado al cáncer se puede utilizar para el desarrollo de una prueba clínica. Del mismo modo, la alta expresión del lncRNAs HULC es asociado a hepatocarcinoma y es detectable en la sangre de pacientes con hepatocarcinoma por métodos convencionales de PCR (Costa FF 2009 y Costa FF 2010).

Otros ncRNAs pueden ser utilizados como biomarcadores para detectar las etapas tempranas en el desarrollo de cáncer, tales como MALAT-1. Este lncRNA se expresa en las primeras etapas de adenocarcinoma de pulmón, siendo un factor predictivo para el desarrollo posterior de metástasis, por lo tanto es un candidato interesante para su estudio como diagnóstico en cáncer (Diederichs S 2010).

Dado el potencial que tienen los ncRNAs, que los han llevado hasta su utilización como dianas terapéuticas y el hecho de que estos ncRNAs se encuentre reprimidos o inducidos en algunos tipos de cáncer cuando se compara su expresión en el tejido no canceroso, hace de los ncRNAs atractivos blancos de siRNAs (RNAs de interferencia) o de pequeñas moléculas con la finalidad de regular o controlar su expresión y función. En este sentido una nueva empresa OPKO-CURNA's fue fundada con el objetivo de diseñar un nuevo tipo de terapia, la tecnología de CURNA's se basa en la regulación de la producción de proteínas a través de la interferencia de un RNA no codificante (antisentido natural). En contraste con la utilización de un RNA de interferencia o la terapia génica, la plataforma de CURNA's utiliza antagoNATs: oligonucleótidos de cadena sencilla químicamente modificados, que interfieren con la función de los transcriptos antisentidos naturales (NAT) y varios ncRNAs son de la clase NAT. Esto habrá un área completamente nueva en la investigación para el descubrimiento y desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer u otras enfermedades (Costa FF 2009 y <http://www.opko.com/therapeutics/opko-curna/>).

Una importante contribución del papel que juegan los lncRNAs en el desarrollo del cáncer se podría obtener a través del análisis integrado de múltiples conjuntos de datos de expresión (Cremaschi P et al., 2015). Por lo anterior, se llevó a cabo un análisis de todo el transcriptoma en esferoides de células MCF-7, para poder explorar la participación de los lncRNAs y mRNAs en el fenotipo asociado a cáncer de mama en las etapas tempranas de crecimiento tumoral, utilizando esferoides con un tamaño en promedio de 200 μm dado que desde etapas iniciales de formación ya exhiben un fenotipo de resistencia multicelular clásica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando algunas de las desventajas que presentan los cultivos en monocapa y que existen pocos estudios relacionados con la expresión génica en cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) de estadios tempranos, se evaluó la expresión de genes mRNAs y lncRNAs en MTS *versus* monocapa de la línea celular MCF-7.

HIPÓTESIS

Existen genes mRNAs y RNAs no codificantes largos que se expresan de forma diferencial en cultivos en monocapa y cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) de la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y evaluar en esferoides de células de cáncer de mama la existencia de RNAs no codificantes largos (lncRNAs) y mRNAs diferencialmente expresados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer cultivos de esferoides tumorales multicelulares de células de cáncer de mama (MCF-7).
- Identificar las capas celulares que conforman a los esferoides tumorales multicelulares (MTS) en estadios tempranos.
- Determinar la capacidad de migración de células cultivadas como monocapa *vs* células provenientes de esferoides de la línea celular MCF-7.
- Evaluar el comportamiento de las fases del ciclo celular en esferoides tumorales multicelulares (MTS) de estadios tempranos *versus* células cultivadas en monocapa.
- Identificar la expresión de genes lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados entre cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) *versus* cultivos en monocapa.
- Analizar las principales vías canónicas que involucren a los mRNAs expresados diferencialmente e identificar si existen vías relacionadas con ciclo celular a través del programa IPA.
- Evaluar si existen diferencias en el proceso de respiración entre cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) de estadios tempranos y cultivos en monocapa.

ANTECEDENTES

Existen pocos estudios relacionados con la expresión génica en cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) de cáncer de mama y que además comparen dicha expresión con cultivos convencional en monocapa. Entre algunas aproximaciones de estudio en esta área de investigación tenemos el de Morrison BJ et al., (2012) quienes evaluaron y compararon la proteómica en células MCF-7 crecidas como esferoides y monocapa, encontrando que los esferoides mostraron una enriquecida y alta expresión de proteínas relevantes para la tumorigénesis entre ellas MUC1 y Galectina 1 y 3. La Galectinas están relacionadas principalmente en las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, metástasis, angiogénesis, progresión del tumor y resistencia a la apoptosis. A su vez MUC1 es una proteína anti-apoptótica que promueve el crecimiento celular (Morrison BJ et al., 2012).

Otro estudio semejante al anterior donde compararon el perfil proteómico en esferoides de células MCF-7 y células cultivadas como monocapa encontrando nuevamente que los esferoides mostraron una alta expresión de ciertas proteínas involucradas en el metabolismo celular como es GAPDH, proteínas de respuesta a estrés Hsp27 y FKBP4 (Li G et al., 2013) así como GIPC1 que es una proteína citoplásmica que sirve como un andamio al interactuar con numerosos complejos de los receptores involucrados en la transducción de señales (Li G et al., 2013 y Chittenden TW et al., 2010). A su vez las proteínas GAPDH y FKBP4 juegan un papel importante en la resistencia a la quimioterapia en cáncer de mama (Li G et al., 2013).

Por otro lado se ha evaluado la expresión diferencial de miRNAs, así como se han podido identificar características particulares de células madres cuando se comparan estos perfiles entre cultivos en esferoides y monocapa de células MCF-7. Encontrando que los esferoides son enriquecidos con propiedades de células madres de cáncer (CSC) entre ellas la auto-renovación, incremento en la expresión de marcadores de CSC tales como CD44+/CD24- y ALDH+ y un

incremento en la resistencia a la quimioterapia. Además de que los esferoides presentan una mayor capacidad de proliferación, migración e invasión en comparación con las células en monocapa. Con respecto a la expresión de los miRNAs varios de ellos fueron identificados por estar inducidos en esferoides y relacionados con cancer de mama tal es el caso del miR-410 que regula la progresión del ciclo celular, el miR-127 que esta asociado con la senescencia celular, el miR-411 un marcador de cáncer de mama, el miR-1246 relacionado con apoptosis y el miR-493 que participa en la resistencia a antineoplásicos. Además, se encontraron otros miRNAs inducidos en esferoides que aun no habían sido asociados con cáncer de mama, pero si con otros tipos de cáncer como es el caso del miR-381, miR-409 y miR-4508 que fueron involucrados en la resistencia celular, metástasis y por regular factores de transcripción oncogénicos, respectivamente (Boo L et al, 2016).

Todos estos datos generados a partir de los estudios de expresión génica en esferoides sugieren que el modelo es funcional para poder identificar nuevos genes diana que estan involucrados en la tumorigénesis, inclusive en la resistencia celular a la quimioterapia y que después podrian usarse como biomarcadores potenciales en el diagnóstico y terapia en cáncer.

MÉTODOS

I. Cultivo de la línea celular MCF-7

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 fue obtenida a partir de la ATCC (American Type Culture Collection #HTB-22, Manassas, VA, USA) y fue cultivada en medio EMEM (Eagle's Medio esencial mínimo) que contiene 2 mM L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio (ATCC #30-2003) suplementado con 5% de suero fetal bovino (ATCC #30-2020), 100 I.U./ml penicilina y 5 µg/ml estreptomicina (ATCC #30-2300), a 37°C en 5% de CO₂.

II. Formación de esferoides

Para la formación de esferoides de la línea celular MCF-7 se utilizó la técnica de líquido sobrelapante con algunas modificaciones (Yuhás JM et al., 1977). Brevemente, se sembraron 1 X 10⁶ células en cajas de cultivo en suspensión de 12.5 cm² (# sc-200257 UltraCruz, Biotechnology, CA, USA) ajustando a un volumen final de 4 ml con medio Leibovitz's L-15 (ATCC #30-2008) suplementado en las mismas condiciones que EMEM médium (Previamente descrito). Las cajas fueron colocadas en una incubadora orbital a 37°C con agitación rotatoria constante de 54 rpm durante ocho días, renovando el medio a las 24 h y después cada 48 h.

III. Determinación del crecimiento de los esferoides

El tamaño de los esferoides se determinó recolectando una submuestra a los dos, cuatro, seis y ocho días de cultivo, fijándolos en formaldehído al 4% en PBS (solución buffer salina de fosfatos). Posterior a ello, se midieron los 2 diámetros ortogonales (a y b) de 30 esferoides de cada día, usando un microscopio invertido AXIO Scope A1 y un Axiovision 4.8.2.0 versión software (Carl Zeiss). Determinando el diámetro medio geométrico (D_G) donde $D_G = \sqrt{a \times b}$ (Kelm JM et al., 2003).

IV. Histología de los esferoides

Los esferoides de dos, cuatro, seis y ocho días fueron fijados en formaldehído al 4% en PBS (Solución buffer salina de fosfatos), para después ser incluidos en parafina y seccionados (5 μ m). Para la caracterización de los esferoides, los cortes fueron procesados y evaluados con diferentes técnicas. Primero se realizó una tinción usando 4', 6-diamino-2-penilindol (DAPI). Únicamente los cortes del día 6 se tiñeron con hematoxilina de Mayers (H&E) y en paralelo, se realizó una incubación con los anticuerpos primarios diluidos en albumina de suero bovino 1:200 para anti-Ki67, 1:100 para anti-p27Kip1 y la misma dilución para anti-HIF 1- α . Finalmente la unión del anticuerpo fue visualizada mediante la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa. (#K0690 LSAB™+ Kits, Universal Dako, Sao Paulo, Brazil) y contrarrestados con hematoxilina de Mayers (H&E). Los cortes de los esferoides fueron analizados usando un microscopio Axiovert 200M y AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss). Se contabilizó el número de células que fueron positivas a la reacción avidina-biotina-peroxidasa. Los anticuerpos utilizados fueron, Anti-HIF 1- α (Factor 1 inducible de hipoxia, AB3883 Upstate Millipore), anti-p27Kip1 (inhibidor de cinasa dependiente de ciclinas 1B, ab54563 abcam) y anti-Ki67 (Marcador de proliferación Ki-67, AB9260 Millipore Chemicon).

V. Ensayos de migración

Las células cultivadas como monocapa y células de esferoides de 6 días disgregados con Accumax (# SCR006 Chemicon) se compararon con la técnica de monitoreo de la migración en tiempo real a través de la Placa CIM-16 y xCELLigence Sistema RTCA Instrumento DP (ACEA Biosciences, Inc, San Diego CA, 92121 EE.UU.). En este sistema, 40.000 células de cada condición de cultivo se sembraron en la cámara superior de una Placa CIM-16 sin FBS. A continuación, la cámara superior se colocó sobre la cámara inferior que contiene la placa CIM-16 suplementado con 10% de FBS como un atrayente o sin FBS (control negativo). La migración celular se controló durante un

período de 24 a 30 horas. Tres ensayos se realizaron con cada condición de cultivo y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de *t* de Student.

VI. Análisis del ciclo celular

Células en monocapa y esferoides de seis días de cultivo fueron disgregados usando Accumax (#SCR006 Chemicon), una vez disgregados se neutralizó la suspensión celular con medio EMEM con suero bovino fetal al 5%. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de 70 μm (#352350 Falcon Corning, Tewksbury, MA, USA). El ciclo celular fue determinado por citometría de flujo utilizando el Kit DNA Reagent (Cycletest Plus #340242, BD, Billerica, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se ajustó a una concentración final de 1.5×10^6 células/ ml de cada condición con solución buffer. Las muestras fueron procesadas en un BD FACSAria cell sorter 3 y analizadas usando el software ModFit LT version 3.2. Cada ensayo individual fue realizado por triplicado y para el análisis estadístico se utilizó *t* de Student.

VII. Purificación del RNA total de células MCF-7 en monocapa y esferoides.

El RNA total, fue aislado a partir de células en monocapa y esferoides de seis días de cultivo utilizando el método de columnas de separación *PARIS™ Kit* (#AM1921, Applied Biosystems, Woburn, MA, USA) que excluye el RNA menor a 200 pb. Brevemente, se utilizaron 6×10^6 células, las cuales fueron recolectadas por arrastre con ayuda de un gendarme en el caso de las células en monocapa. Los esferoides se recolectaron por sedimentación y se continuó con el protocolo especificado por el fabricante. La concentración del RNA fue determinada usando un NanoDrop 1000 (Spectrophotometer, Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA) y además se analizaron en un gel 2% agarosa en condiciones desnaturizantes. Posterior a ello, se evaluó el número de integridad del RNA (RIN) por electroforesis capilar automatizada (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) utilizando el chip Agilent RNA 6000 Nano, los valores obtenidos para todas las muestras fueron mayores a 9. Finalmente, se eliminó el RNA

ribosomal de las muestras por medio del kit RiboMinus Eukaryote (# A1083708 Invitrogen, Oregon, USA). Brevemente, sondas complementarias para las moléculas del RNA ribosomal (28S, 18S, 5S y 5.8S) marcadas con biotina, fueron eliminadas a través de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. La efectiva eliminación del RNA ribosomal se corroboró por electroforesis capilar en el bionalizador Agilent 2100.

VIII. Transcriptoma del RNA por secuenciación masiva

La construcción de las bibliotecas de cDNA a partir de los transcriptomas totales de células cultivadas en monocapa y esferoides de seis días de cultivo, fue realizada con el equipo TruSeq RNA (RS-122-2001, Illumina, San Diego, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y cada biblioteca fue analizada por electroforesis capilar automatizada (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) utilizando el chip DNA-1000. Las bibliotecas fueron cuantificadas por fluorometría (Qubit fluorometer, Invitrogen) y finalmente secuenciadas en el equipo de genomas GAIIx (Illumina) con una configuración de corrida de 2 X 72 bp. Se obtuvo un total de lecturas de 30,467,063 para cultivos en monocapa y 24,363,843 para cultivos en esferoides, posterior a ellos se evaluó la calidad de las lecturas obtenidas del secuenciador utilizando el programa FastQC (FastQC v0.10.1), en donde la mediana de los datos se encontraron por arriba del $q > 30$. Una vez corroborando la calidad los datos estos fueron analizados usando el CLC genomics Workbench (versión 7 CLC Bio Cambridge, MA). En donde los parámetros utilizados fueron los siguientes; alineación con 2 número máximos de desajustes; una fracción de longitud mínima de 0.9; una fracción de similitud mínima de 0.8, y 10 hits máximos para una lectura. El rango de las lecturas mapeadas fue de 16×10^6 - 28×10^6 . Todos los transcriptos con un nivel relativo de expresión inferior a 0.2 y menores a 10 lecturas fueron filtradas y eliminadas.

Para evaluar la expresión diferencial de lncRNAs y mRNAs, se midió el número de veces de cambio de expresión (fold -change) de cada gen entre cultivos en monocapa y cultivos de esferoides

multicelulares (MTS). Para ello, se realizó una división de la mediana de expresión mayor entre la mediana de expresión menor de cada gen. Cuando la mediana de expresión de un gen en esferoides fue menor que la mediana del mismo gen en monocapa el cociente se designó negativo y por lo tanto fueron clasificados como genes reprimidos y por el contrario, cuando la media de expresión del gen en esferoides fue mayor que en monocapa el cociente se designó positivo o genes inducidos. Los cultivos en monocapa se utilizaron como control.

IX. Validación por PCR tiempo real (qPCR) de los lncRNAs

Se seleccionaron al azar 3 lncRNA inducidos y 4 suprimidos con un fold-change mayor a 2. La secuencia de cada gen fue obtenida a través de LNCipedia 3.0 de libre acceso (<http://www.lncipedia.org/>). Con respecto a los mRNAs se seleccionaron de forma arbitraria 8 genes relacionados con fosforilación oxidativa, ciclo celular, etc. y con el uso del software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) se diseñaron los cebadores específicos para cada transcripto (**Tabla 1**). El cDNA fue sintetizado a partir de 2µg de RNA total y con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis para RT-qPCR (#K1642 Thermo Scientific) que contiene oligos (dT) y cebadores hexameros al azar y que recomienda una temperatura de 65°C para RNAs que tiene una gran cantidad de estructuras secundarias. Primero, a través de una PCR punto final se evaluó la expresión y se estandarizó la amplificación de cada uno de los genes en ambas condiciones (monocapa y esferoides). Se realizaron dos ensayos independientes para cada condición para los lncRNAs y tres ensayos independientes para validar los mRNAs, usando el gen TBP (TATA Box Binding Protein o proteína de unión a la caja TATA) como control endógeno y que además presenta una baja expresión en MCF-7 (Tricarico C. et al., 2002). Los productos de amplificación se corrieron en un gel de 4% agarosa en TAE Buffer. La correcta amplificación para todos los amplicones fue verificada usando secuenciación capilar con el analizador de DNA Sanger capillary Applied Biosystems 3730xl. Posterior a ello, qPCR fue realizada usando SYBR Select Master Mix

Maxima (#4472908 Applied Biosystems). El análisis se llevó a cabo usando el equipo 7500 Real-Time PCR Systems y el software detector de secuencias versión 1.4 (Applied Biosystems). El nivel de expresión de cada gen lncRNA y mRNA fue representado como la expresión relativa usando el método de curva estándar relativa para los lncRNAs y $\Delta\Delta C_t$ para los mRNAs. Las muestras fueron normalizadas usando el gen TBP. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA para el caso de los lncRNAs y una *t* de student para los mRNAs. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

X. Consumo de oxígeno y determinación del flujo en la fosforilación oxidativa (FO)

Para determinar el consumo de oxígeno se realizaron cultivos en monocapa (con un 80% de confluencia) y esferoides de seis días de cultivo. Ambos cultivos fueron disgregados utilizando accutasa (# 00-45555-56, eBioscience) durante 5 minutos a 37 ° C. Las células se colectaron y se lavaron suavemente con medio fresco y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 37 ° C. Después las células se suspendieron en 200-300 μ L de medio Ringer- Krebs (que contiene; NaCl 125 mM, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES y 1,4 mM CaCl₂ con un pH = 7,2). Las tasas de consumo de oxígeno se midieron en un minioxímetro Strathkelvin Instruments 782 (North Lanarkshire, Escocia, Reino Unido) en interface con un ordenador. Las tasas de respiración basal se obtuvieron mediante la adición de 1×10^6 células en monocapa o esferoides de 6 días de cultivo a 200 μ L de medio Krebs-Ringer saturado con aire. Para determinar el flujo de fosforilación oxidativa (FO) se adicionaron 5 μ M oligomicina y para determinar el grado de acoplamiento de la respiración mitocondrial se adicionó 6 μ M cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP). En paralelo, se añadió NaCN 1 mM para inhibir completamente el consumo de oxígeno mitocondrial. Cinco ensayos se realizaron con cada condición de cultivo y el análisis estadístico se realizó mediante la pruebas *t* de Student. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

Tabla 1. Primers o cebadores de los lncRNAs, mRNAs y TBP (control endógeno)

Cebadores		Secuencias
lnc-CAMK1G-1:2	Directo	5'-CTCCCTGCTTCGGGTCAGA-3'
	Reverso	5'-GCCCCATAAAAGGCTGTTCTC-3'
lnc-PPP2R4-4:1	Directo	5'-CCCTGCACGTGGATATTAGAGTTT-3'
	Reverso	5'-GGGACCTTGACCTACAAAATC-3'
lnc-AGBL1-4:1	Directo	5'-AATGGCAACCATCAAATCAAGA-3'
	Reverso	5'-GCAAAGCATCACAATTCATGGA-3'
lnc-KIAA1755-5:3	Directo	5'-TCTCGAAATCTGCAGACATCTTG-3'
	Reverso	5'-GTGAGAGTGGAGCCGACCAT-3'
lnc-IGSF5-1:1	Directo	5'-GGGCCACAACCTCAACCCATA-3'
	Reverso	5'-GCTGGTCGTTGCTCAAGAAAC-3'
lnc-MLN-1:2	Directo	5'-TTCAGGCCCCGAGTTTCTC-3'
	Reverso	5'-GGGCAAGGGCAGAGTAGGA-3'
lnc-CPEB4-6:1	Directo	5'-ACCTCTCCTGCGTTTGATCTG-3'
	Reverso	5'-GGCCGTGGGCAAGTTACTT-3'
MYC	Directo	5'-GTTTGCCATTACCGTTTCTC-3'
	Reverso	5'-TGCAGAAGGTCCGAAGAAAG-3'
GAPDH	Directo	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'
	Reverso	5'-ATGACAAGCTTCCCGTTCTC-3'
HIST1H2AG	Directo	5'-TGCCCAAAAAGACTGAGAGC-3'
	Reverso	5'-AAAGAGCCGTTGGTTTGGAC-3'
ANKRD30A	Directo	5'-AACACGGCTCTCCATTATGC-3'
	Reverso	5'-TAGCCTTGTTGTGCACTTCG-3'
COX8A	Directo	5'-TCCCCTGGATCATGTCATTC-3'
	Reverso	5'-CACCATGGAGACATCAAGAGG-3'
NDUFA1	Directo	5'-CGTGTGCTTGTTGATTCCAG-3'
	Reverso	5'-TGCGCCTATCTCTTCCATC-3'
TP53	Directo	5'-GTCTTTGAACCCTTGCTTGC-3'
	Reverso	5'-CCACAACAAAACACCAGTGC-3'
ITGB6	Directo	5'-CGACTGTGACTGTGGTGAAT-3'
	Reverso	5'-CTTTGGTTCAGAAATGCAAG-3'
TBP	Directo	5'-CCACAGCTCTTCCACTCACA-3'
	Reverso	5'-CTCATGATTACCGCAGCAA-3'

RESULTADOS

I. Caracterización de los MTS.

Una de las características de los MTS es la distribución heterogénea de las células, en donde regularmente encontramos que las células ubicadas en la periferia del esferoide están dividiéndose constantemente, las células en fase quiescente se presentan en las capas intermedias, mientras que en el centro se forma un núcleo necrótico y/o apoptótico, pero todo ello dependerá del tamaño del esferoide (Desoize B y Jardillier J 2000). Por lo que, primero se realizó una caracterización de los MTS en células MCF-7 para identificar la existencia de dichas capas celulares, para ello se cultivaron esferoides durante ocho días y se midió el diámetro medio geométrico D_G de los esferoides a los dos, cuatro, seis y ocho días de cultivo, el cual se encontró en un promedio de ± 130 a ± 200 μM entre los dos y seis días de cultivo y finalmente se obtuvo un tamaño mayor a los ocho días con un promedio de D_G entre 230 μM (Figura 7A). Después con la tinción de DAPI se identificó la estructura interna del esferoide, a los seis días de cultivo no se observaron centros necróticos o libres de células, similar a los esferoides de dos y cuatro días (Figura 7B, panel a, b y c). Sin embargo al octavo día de cultivo se observaron algunos esferoides con un centro libre de células (Figura 7B, panel d). Para corroborar lo anterior, la tinción de hematoxilina mostró células y núcleos bien definidos en todo el esferoide incluso en el centro (Figura 7C panel a). Y posterior a ello se identificó a la proteína nuclear Ki67 que está activa durante todas fases del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero se encuentra ausente en células en quiescencia (G0) (Scholzen, T., y Gerdes, J. 2000). En secciones de esferoides a los 6 días de cultivo, Ki67 se observó en un 40% de las células que se encontraban en las capas periféricas del esferoide principalmente (Figura 7C panel b). Una fracción mayor de células ubicadas en las capas internas del esferoide fueron positivas para la proteína p27Kip1, un inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas y que además es un marcador de células quiescentes y que regula la transición entre la fase G0 a fase de síntesis (Figura 7C

panel c). También, se determinó si a los seis días de cultivo existía una expresión de HIF1 α (Factor inducible de hipoxia 1 α) como un marcador de hipoxia, sin embargo no se observó expresión de dicha proteína (Figura 7C panel d). En conclusión, los esferoides a los seis días de cultivo se encontraron consolidados, no se observaron áreas libres de células como indicador de muerte celular o necrosis y no hubo evidencia de hipoxia. Por lo tanto, todos los ensayos de expresión génica en esferoides se realizaron a los seis días de cultivo.

II. Habilidad de la migración de células MCF-7 cultivadas como MTS.

La activación de la migración en las células tumorales es un requisito previo para dar inicio a una metástasis, por lo que se evaluó la habilidad de migración en células derivadas de esferoides a los 6 días de cultivo. En donde se observó que las células cultivadas como MTS presentaron un incremento considerable en los valores de migración (representado como índice celular) de casi más de 10 veces cuando se comparó con las células cultivadas en monocapa, las cuales prácticamente no presentaron migración (Figura 7D). La migración se dio sólo en la condición con SBF (suero bovino fetal) como un quimioatrayante, dado que sin éste no hubo migración en ambos casos.

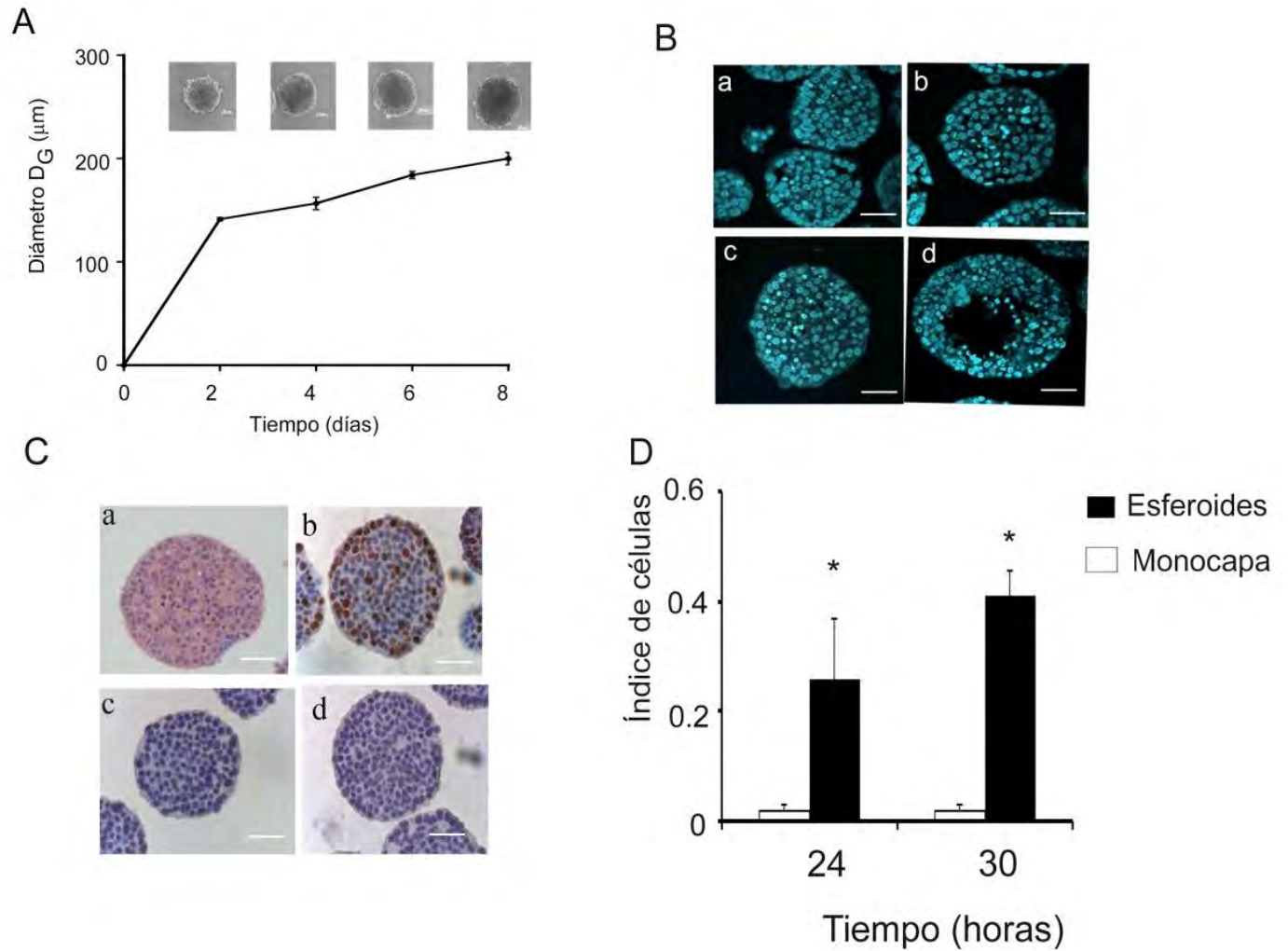


Figura 7. Crecimiento y caracterización de los MTS. (A) Cinética de crecimiento de los MTS a los 2, 4, 6 y 8 días de cultivo. La barra representa la desviación estándar n=3, (B) Núcleos de células en los MTS a los 2, 4, 6 y 8 días de cultivo teñidos con DAPI (panel a, b, c y d respectivamente). (C) esferoides de 6 días teñidos con H&E (a), e inmunohistoquímica con Ki67 (b); p27Kip1 (c) y HIF1 α (d). Escala de la barra 50 μ M. (D) Ensayo de migración de células cultivadas en monocapa vs células derivadas de esferoides a los 6 días de cultivo. * P < 005 t- test. D_G Diámetro medio geométrico.

III. Análisis del transcriptoma en MTS *versus* cultivos en monocapa.

Con la finalidad de ampliar el panorama sobre el transcriptoma de mRNAs y lncRNAs en MTS, se realizó un análisis de la expresión diferencial entre MTS de seis días de cultivo *versus* cultivo en monocapa, usando secuenciación masiva (RNAseq).

IV. Análisis de RNA codificantes (mRNAs).

Se encontraron 1122 transcriptos diferencialmente expresados, de los cuales 921 incrementaron su expresión en esferoides de 6 días de cultivo y 201 transcriptos disminuyeron su expresión; tres de ellos ANKRD30A, HBB y TCN1 fueron expresados únicamente en cultivos en monocapa pero no en esferoides (Figura 8A). Con ayuda del programa IPA (Integrar y entender datos complejos de la ómica /Integrate and understand complex 'omics data, <http://www.ingenuity.com/products/ipa>) se identificaron los 20 genes con mayor fold-change (10 genes inducidos y 10 genes reprimidos) y posterior a ello se buscó información de cada uno, encontrando que todos los genes estuvieron asociados con cáncer de mama y solo 11 de éstos fueron relacionados con metástasis (**Tabla 2**).

Tabla 2. Los principales 20 mRNAs suprimidos e inducidos con mayor alteración, relacionados con cáncer de mama y metástasis.

GEN	Nombre del gen	Referencias
CLDN4*	Claudin 4	Jiwa LS et al., 2014; Abd-Elazeem MA y Abd-Elazeem MA 2015; Lanigan F et al., 2009 ; Blanchard AA et al., 2009
FST*	Follistatin	Mock K et al., 2015; Ohta N et al., 2015; Sengupta D et al., 2014; Karagiannis GS et al., 2013
MIF*	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Zhang M et al., 2015; Verjans E et al., 2009
NPY1R*	Neuropeptide Y receptor Y1	Liu L et al., 2015
PGR*	Progesterone receptor	Aurilio G et al., 2014
PMP22*	Peripheral myelin protein 22	Mimori K et al., 2005; Winslow S et al., 2013; Tong D et al., 2010
S100A9*	S100 calcium binding protein A9	Gumireddy K et al., 2014
TFF1*	Trefoil factor 1	Wang H et al., 2013
RERG*	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	Habashy HO et al., 2011
COL12A1*	Collagen, type XII, alpha 1	Dalgin GS et al., 2007
COL4A5*	Collagen, type IV, alpha 5	Nakano S et al., 1999; Wong NA et al., 2014;
S100A6	S100 calcium binding protein A6	McKiernan E et al., 2010
RPS12	Ribosomal protein S12	Deng SS et al., 2006; Chen D et al., 2012
NAALADL2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2	Whitaker H C et al., 2014
IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Motaghd M et al., 2014; Reich NC et al., 2012
ATP5E	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex	Huber-Keener KJ et al., 2012
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	Scurr LL et al., 2008
RPS21	Ribosomal Protein S21	Dago DN et al., 2015
POF1B	Premature ovarian failure, 1B	Figueiredo NB et al., 2014
RPL36AL	Ribosomal protein L36a-like	Saletta F et al., 2010

*Relacionados con metástasis en cáncer de mama. Letras en negritas muestra los genes reprimidos en MTS.

Posterior a ello con el programa DAVID (Bioinformática Funcional Anotacion de Microarreglos, <https://david.ncifcrf.gov/>) se realizó un escaneo de todos los mRNAs expresados. De manera interesante, se identificaron algunas proteínas de membrana que pudieran contribuir con la consolidación y comportamiento en los MTS de esta etapa inicial de formación. Tal es el caso, de E-cadherina, EPCAM y Claudina 4 que fueron inducidas en esferoides. Sin embargo, las proteínas Claudina 1, Plexina 2, Integrina beta 6, sindecanos 1 y 4 e integrina alfa 2 disminuyeron su expresión en comparación con las células en monocapa (Figura 8C).

Con la finalidad de obtener una mayor perspectiva de los procesos biológicos que involucran a los genes mRNAs diferencialmente expresados se realizó un análisis de las vías canónicas utilizando el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Las 5 principales vías canónicas enriquecidas fueron; disfunción mitocondrial (Figura 8D, 9A y Tabla 3), fosforilación oxidativa (Figura 8D, 9B y Tabla 3), señalización de eIF2 (Figura 8D, 9C y Tabla 3), regulación del factor eIF4 y p70S6K (Figura 8D, 9D y Tabla 3) y señalización de mTOR (Figura 8D, 9E y Tabla 3). En paralelo, se identificaron algunas vías asociadas con ciclo celular, tales como la vía de estrógeno que regula la fase de síntesis (S), checkpoint o punto de control en la fase G1/S del ciclo celular, señales de HER-2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) en cáncer de mama, señalización de PTEN (La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa), ciclo celular regulado por BTG (Glucosidasa beta) y vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT) (Figura 8E y tabla 4).

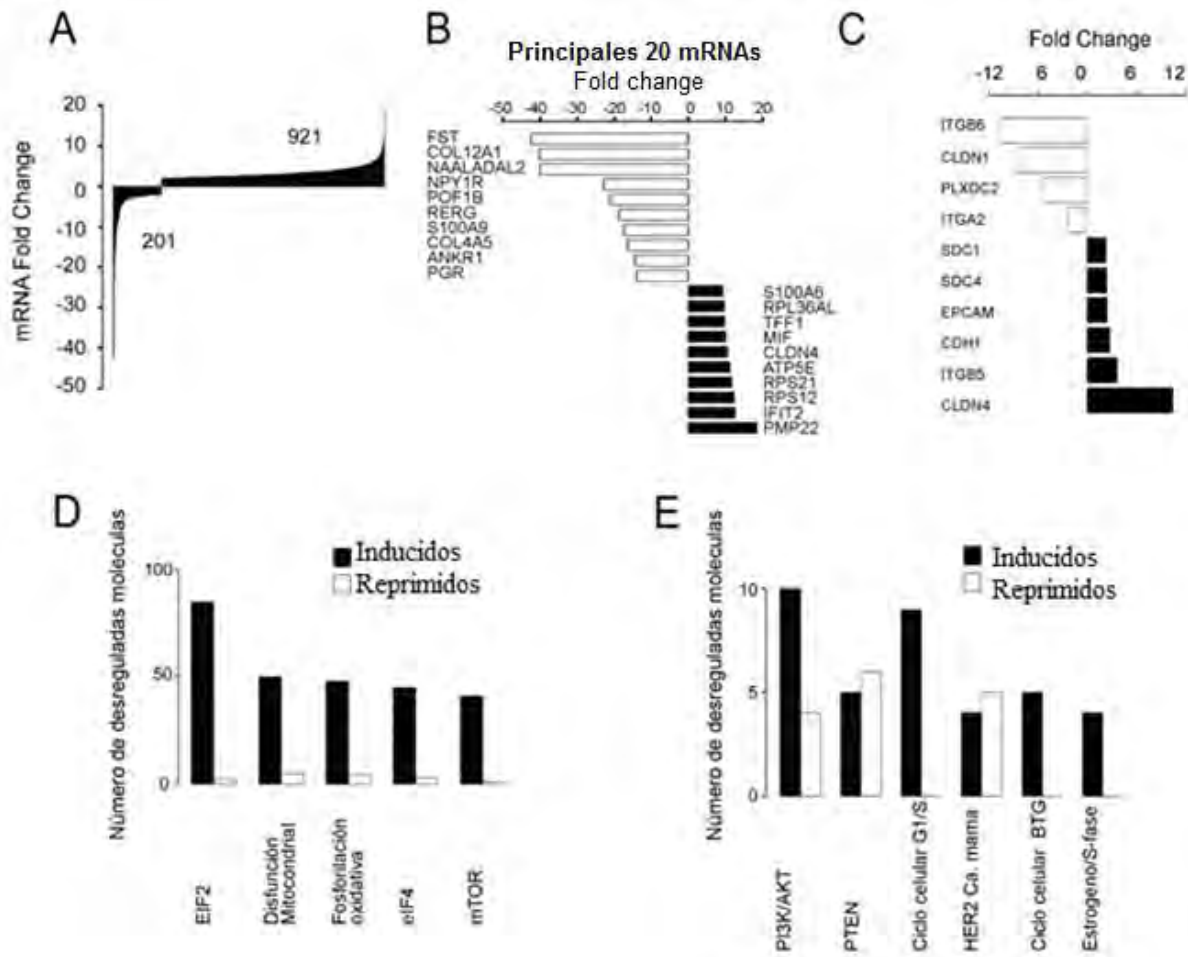


Figura 8. Análisis de los mRNAs expresados diferencialmente en MTS utilizando RNAseq. (A) Distribución del fold-change de todos los mRNAs diferencialmente expresados (B) Los principales 10 mRNAs reprimidos y 10 mRNAs inducidos de acuerdo al programa IPA (C) Genes asociados con adhesión celular y su fold-change (D) Las cinco principales vías canónicas enriquecidas y (E) Vías de señalización canónicas asociadas con ciclo celular usando el software IPA (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com/>). Ca. Mama (Cáncer de mama)

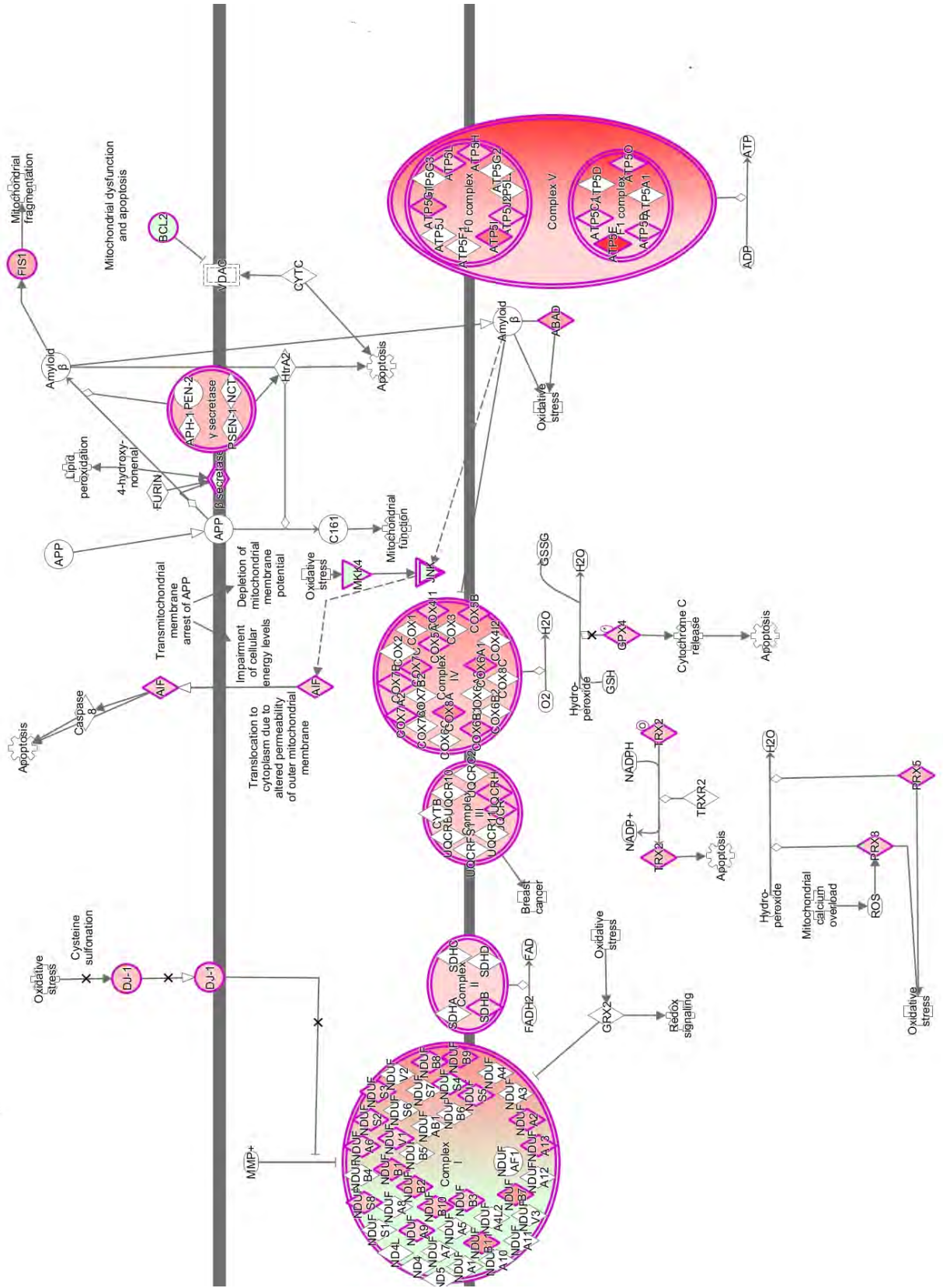
Tabla 3. Las 5 principales vías canónicas (IPA) y sus genes reprimidos e inducidos en MTS

Vía	Inducidos	Reprimidos	Total
1. EIF2	AKT1, PPP1CA, EIF (1/2AK1/2B2/2B5/3B/3C/ 3D/3G/3I/ 3K/3L/4A1-4A3/4G1) RPL (3-8/11-14/17-19/22-24/ 26-27/29-32/34-39/41/10A/ 13A/18A/23A/26L1/35A/36AL/ 37A/7A/P0-P2) RPS (2/3/5-9/11-16/18-21/23/ 25/27-30/15A/3A/4X/A)	PIK3CA y RRAS2	87
2. Disfunción Mitocondrial	<i>Incluye todos los genes de la vía de fosforilación oxidativa mas:</i> AIFM1, APH1A, FIS1, GPX4, HSD17B10, PARK7, PRDX (3/5) y TXN2	BACE2, BCL2, NDUFAF2 y MAP2K4	55
3. mTOR	AKT1, DDIT4, RND3, EIF (3B/3C/3D /3G/3I/3K/3L/4A1-4A3/4EBP1/4G1) PPP2 (R4/R1A), RAC1, RHO (A y C), VEGFA incluyendo todos los genes RPS de la vía de EIF2.	PIK3CA, RICTOR, RPS6KA3 y RRAS2	52
4. Regulación de EIF4 y p70S6K	AKT1, PPP2 (R4/R1A), EIF4EBP1 <i>Incluyendo todos los genes EIF (excepto EIF2AK1) y RPS de la vía EIF2</i>	ITGA2, PIK3CA y RRAS2	48
5. Fosforilación oxidativa	ATP (5B/5C1/5E/5G1/5H/5I/ 5J2/5L/5O) NDUF (A1/A2/A6/A9/A13/B1-B3/ B7-B11/S2-S3/S5/S8/V1) COX (4I1/5A/5B/6A1/6B1/7A2/ 7B/7C/8A), CYB5A, CYC1, SDHB, y UQCR (C1/H).	NDUFS4	42

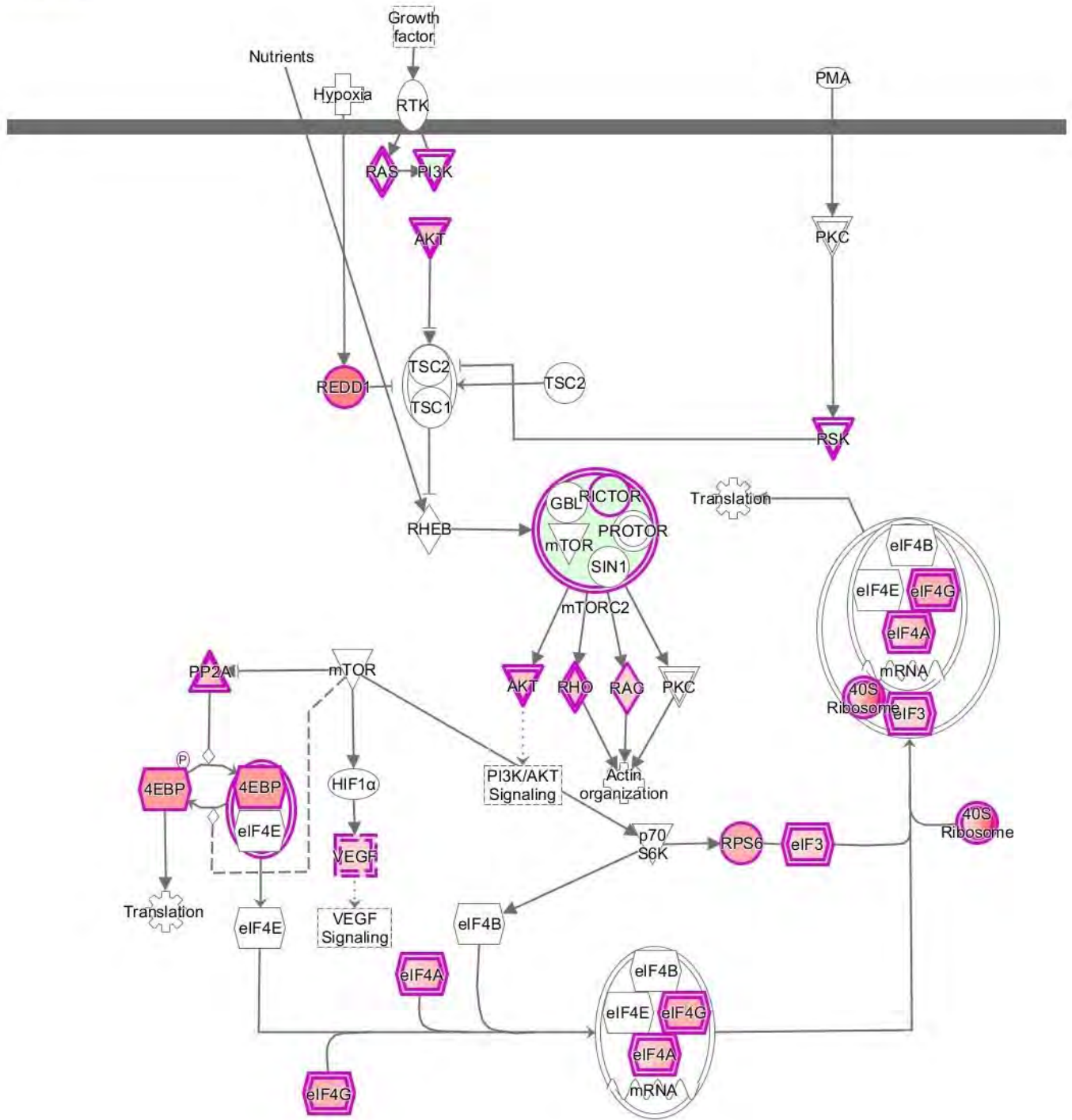
Tabla 4. Vías de señalización relacionadas con ciclo celular y moléculas diferencialmente expresadas (IPA)

Vía	Inducidos	Suprimidos	Total
PI3K/AKT	AKT1, CDC37, CDKN1B, EIF4EBP1, HSP90AB1, HSP90B1, INPPL1, PPP2R4, PPP2R1A y TP53	BCL2, ITGA2, PIK3CA y RRAS2	14
Señales regulas por PTEN	AKT1, CDKN1B, INPPL1, MCRC1 y PIK3CA	BCL2, BMPR2, ITGA2, MAGI3, RAC1 y RRAS2	11
Ciclo celular; Checkpoint G1/S	CDK4, CDKN1B, E2F4, MAX, MYC, PA2G4, TP53 y RPL(5/11)		9
Señales de HER-2 en Cáncer de mama	AKT1, CDKN1B, ITGB5 y TP53	AREG, ITGB6, PARD3, PIK3CA y RRAS2	9
Ciclo celular regulado por proteínas BTG	CDK4, E2F4, PPP2R4, PPP2R1A y PRMT1		5
Estrógeno regula la fase de síntesis (S)	CDK4, CDKN1B, E2F4 y MYC		4

B

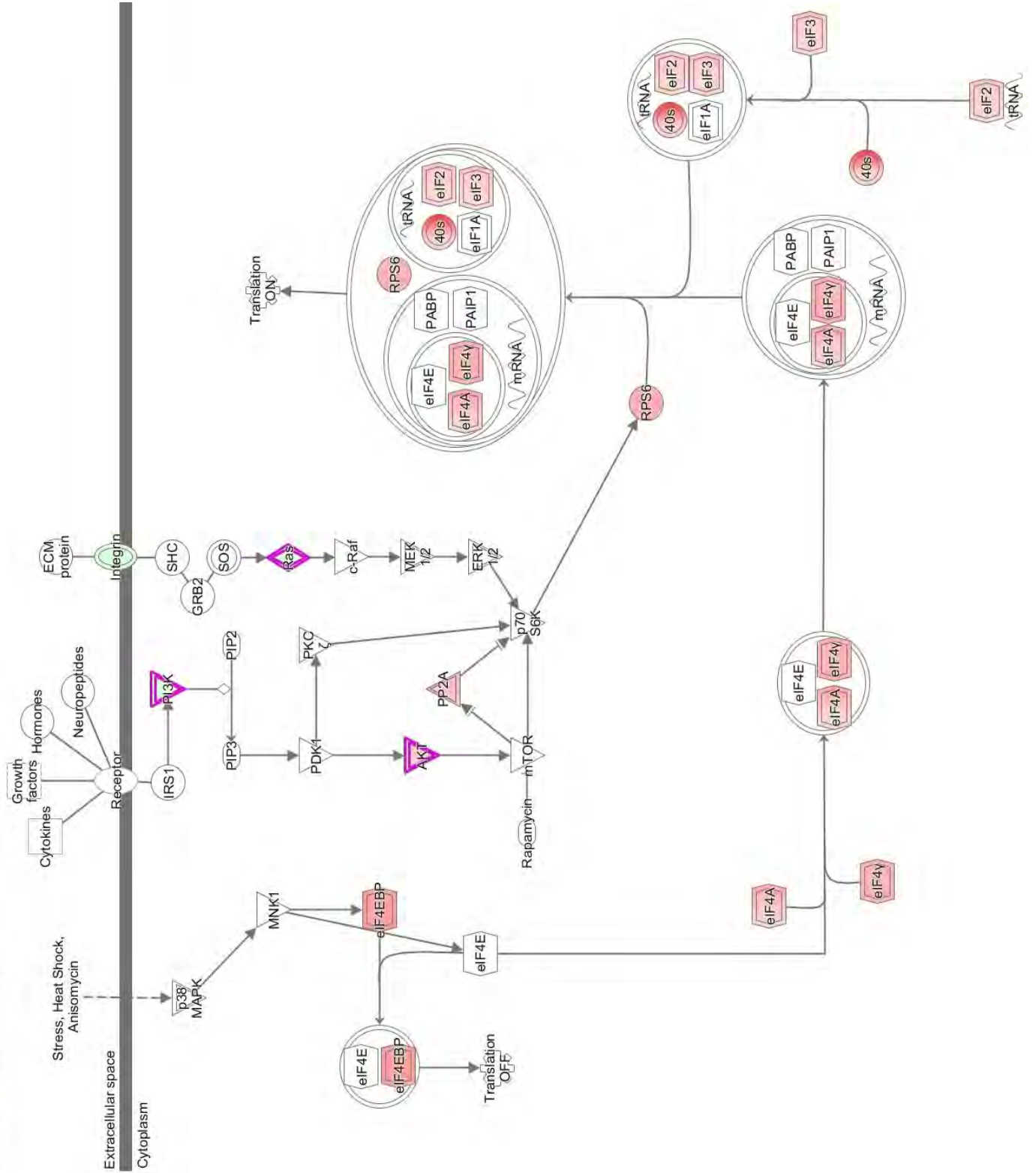


C
mTOR Signaling



D

Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling



E

Oxidative Phosphorylation

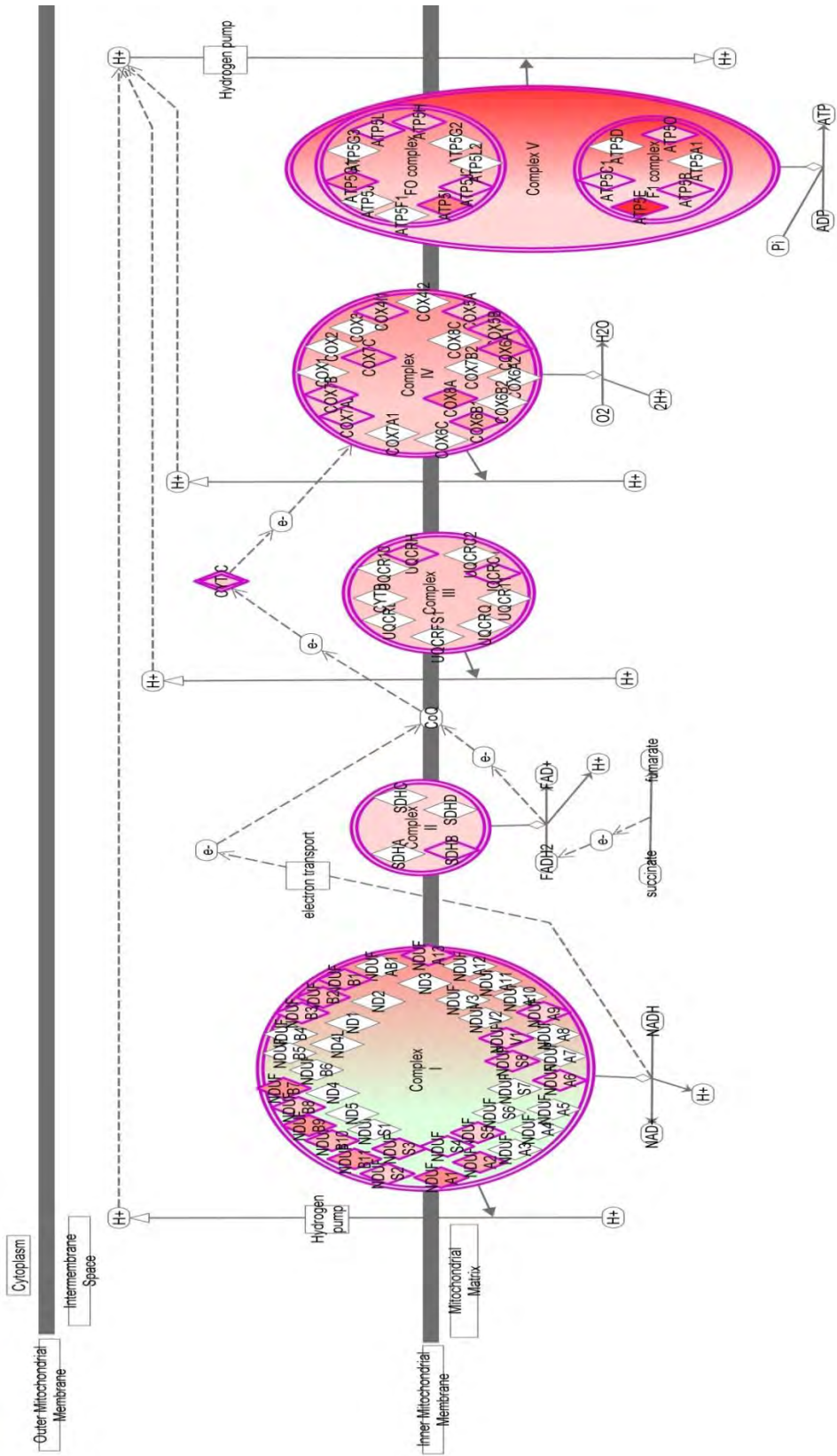
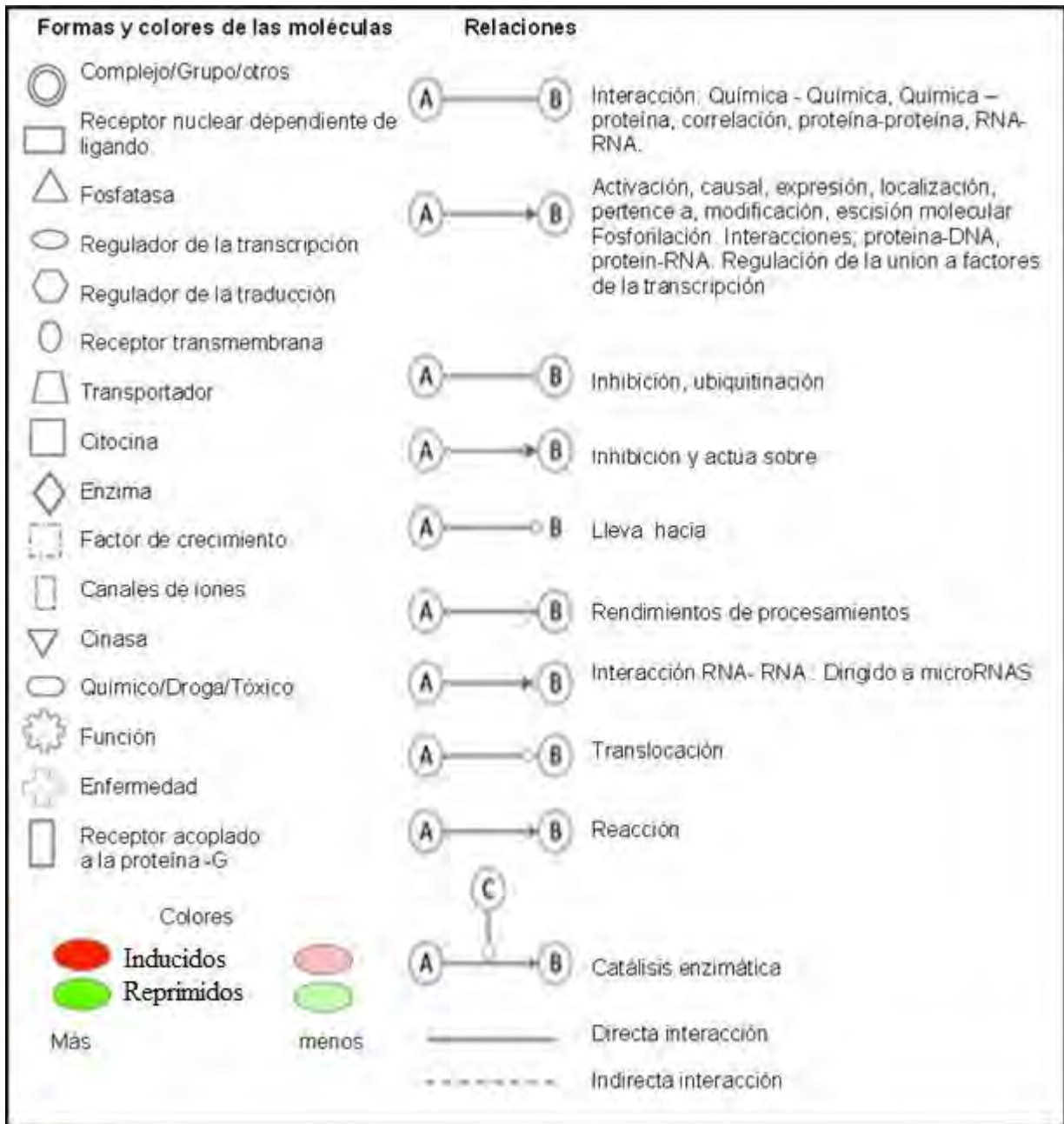


Figura 9. Las cinco principales vías canónicas alteradas en MTS de acuerdo al promaga IPA. **(A)** EIF2 Señales, **(B)** Disfunción Mitocondrial, **(C)** vía de mTOR, **(D)** Regulación de eIF4/p70S6K y **(E)** Fosforilación oxidativa. Ver Cuadro I y II para la nomenclatura de colores, formas, etc.

Cuadro I. Nomenclatura de la formas de las moléculas, colores, relaciones presentes en las imágenes de las vías canónicas (IPA)



Cuadro II. Genes con sinonimo o grupo de genes presentes en las imagenes de las vías canónicas (IPA)

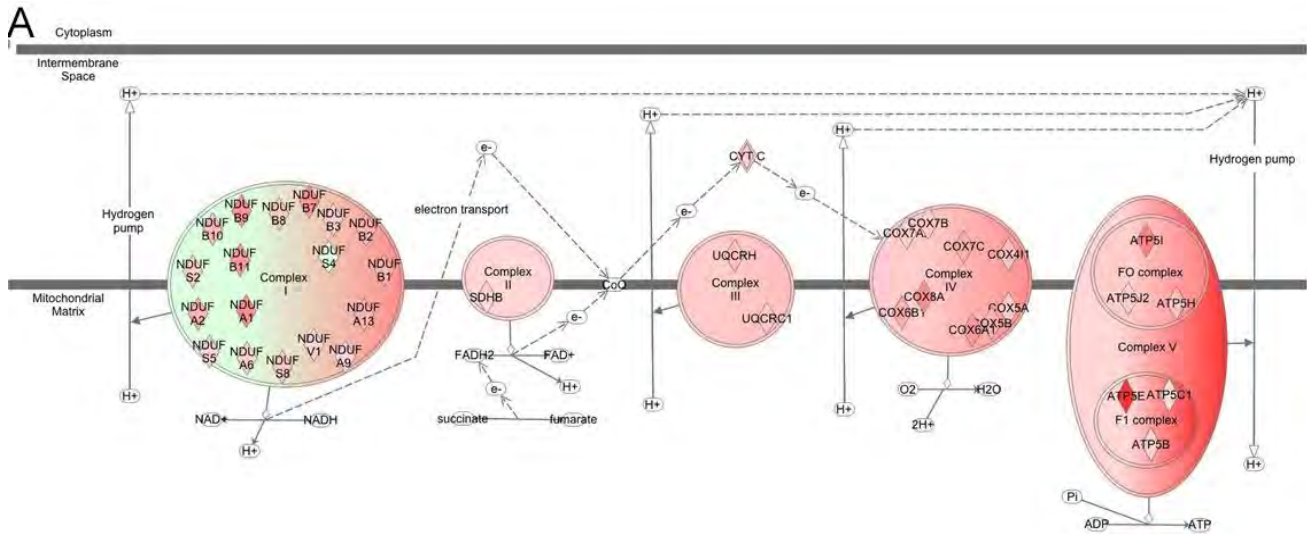
Identificación de genes con sinónimos o grupos de genes de las vías canónicas (IPA)	
Nombre del gen	Nombre del gen en imagen IPA
Todas las RPS	40S subunidad ribosomal
Todas las RPL	60S subunidad ribosomal
APH1A	γ -secretase
BACE2	β -secretase
BMPR2	GFR
CDKN1B	p27Kip1
CYC1	CYT C o complex III
DDIT4	REDD1
EIF1	A121
E2F4	E2F
EIF1, EIF2B2 y EIF2B5	eIF2
EIF2AK1	HRI
EIF2B2 y EIF2B5	eIF2 β
EIF3B, EIF3C, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF3K y EIF3L	eIF3
EIF4A1, EIF4A2 y EIF4A3	eIF4A
EIF4EBP1	4EBP o 4E-BP1 o eIF4BP
EIF4G1	eIF4 γ y eIF4G
FAU	RPS30 de la subunidad ribosomal 40S
INPPL1	SHIP
ITGA2	Integrin
ITGB6 y ITGB5	β -Integrin
LMNA	Lamin A
MAP2K4	MKK4 o JNK
MCRS1	MSP58
PA2G4	EBP1
PARK7	DJ-1
PIK3CA	PI3K
PPP2R4 y PPP2R1A	PP2A
RND3	RHO
RPS6KA3	RSK
TXN2	TRX2

Encontramos que dentro de las 5 principales vías canónicas, dos estuvieron relacionadas con el metabolismo energético mitocondrial; la vía de la fosforilación oxidativa y disfunción mitocondrial enriquecidas con 42 y 55 mRNAs genes respectivamente (Tabla 3). Donde se incluyen proteínas del complejo I (NADH, NDUF), complejo II (SDHB), complejo III (UQCRC1, UQCRH), complejo IV (varias isoformas de COX) y complejo V (sintasa F1FO-ATP) (Figura 10A y 10B, Tabla 3). Además, se encontraron otras proteínas asociadas con el transporte mitocondrial como son TOMM22, TOMM5, TOMM6 y TOMM7 (Figura 10B). Finalmente, se identificaron varios genes involucrados en la vía de glucólisis como fueron ENO1, FBP1, G6PD, GAPDH, ODC1, PDHB, PGD, PGK1, SDHB, TALDO1, TKT, TPI1, PFKL, ALDOA PGK1 así como AKT1 un regulador en el metabolismo de glucosa (Jeffrey C. Rathmell et al., 2003) y todos estos genes fueron inducidos en MTS (Figura 10C)

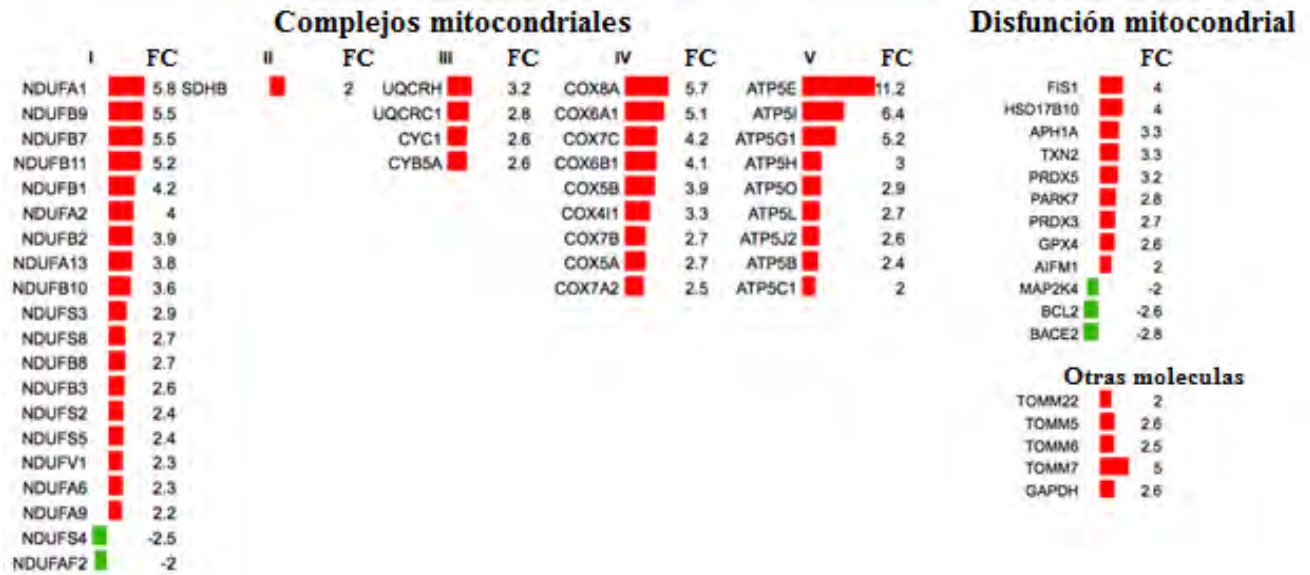
V. Los MTS de estadios tempranos en MCF-7 muestran una hiperactivación del metabolismo oxidativo mitocondrial.

La mitocondria es el sitio del metabolismo oxidativo, al encontrar un gran número de genes diferencialmente expresados en estas vías, se midió la tasa de consumo de oxígeno y el flujo de la fosforilación oxidativa (FO). Primero se evaluó la respiración basal, en donde las células de MTS de seis días presentaron un incremento en la respiración de dos veces más con respecto a las células de monocapa (10.3 y 5.2 ngAo/min/ 10^6 células respectivamente) (Tabla 5). Para evaluar el flujo de la fosforilación oxidativa, se adicionó oligomicina (un inhibidor específico de la F1FO-ATP sintasa). En donde, los MTS presentaron un considerable incremento en la respiración acoplada a la síntesis de ATP con respecto a las células en monocapa (3.0 y 1.7 ngAo/min/ 10^6 células, respectivamente) (Tabla 5). Además, se evaluó el grado de acoplamiento mitocondrial, adicionando el protonóforo CCCP, que disipa el gradiente de protones electroquímico mitocondrial ($\Delta\mu\text{H}^+$) y estimula la respiración a su valor máximo. Una vez más, los MTS presentaron un incremento mayor

de consumo de oxígeno que las células en monocapa con valores de 17.2 ± 1.6 vs 7.1 ± 1.1 ngAo/min/ 10^6 células, respectivamente (Tabla 5). Un buen parámetro para estimar el acoplamiento mitocondrial es la relación entre la respiración no acoplada y respiración basal (U/B.R.). Los valores obtenidos para este parámetro fueron de ~ 1.7 y ~ 1.3 veces de cambio, para MTS y células en monocapa respectivamente (Tabla 4). Todos estos resultados sugieren que las mitocondrias en MTS de seis días de cultivo tienen una mayor actividad de FO y una mayor síntesis de ATP acoplada a una mayor actividad de la cadena respiratoria (hiperactivación del metabolismo oxidativo).



B



C

GLUCÓLISIS	FC
FBP1	3
G6PD	2
ODC1	3
PDHB	2
PGD	2
PGK1	2
SDHB	2
TALDO1	3
TKT	3
TPI1	3
PFKL	5
ALDOA	5
ENO1	5
MDH1	3
FH	2
CS	2
AKT1	3
MYC	4

Figura 10. Hiperactivación del metabolismo oxidativo mitocondrial en MTS. **(A)** Imagen de los mRNAs mitocondriales diferencialmente expresados en los cinco complejos de la fosforilación oxidativa (IPA). **(B)** Fold-change (FC) de los mRNAs diferencialmente expresados en los cinco complejos en la fosforilación oxidativa, proteínas mitocondriales y otras proteínas involucradas. **(C)** genes involucrados en glucólisis. El color Rojo indica genes inducidos en MTS y en verde los genes reprimidos

Tabla 5. Tasas de consumo de oxígeno y flujo de la fosforilación oxidativa en células MCF-7 de monocapa y MTS de seis días de cultivo

	Monocapa	MTS
Respiración basal (B.R.)^a	5.2 ± 2	10.3 ± 2.7 ***
+ 5 μM oligomicina	1.7 ± 0.4	3 ± 0.4 **
+ 1 mM NaCN^b	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3
Flujo FO^c	3.5 ± 1.8	7.3 ± 2.5 **
Respiración no acoplada (U)^d	7.1 ± 1.1	17.2 ± 1.6 **
U/B.R.	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1 *

Todos los valores son mostrados en ngAo/min/10⁶ células. Los datos de cinco ensayos independientes son expresados como la media ± SD. La prueba estadística utilizada fue *t*-test para datos pareados donde; *<0.05, **<0.005 y ***<0.0005.

^a La respiración basal se determinó en ausencia de donadores de electrones exógenos o fuentes de carbono.

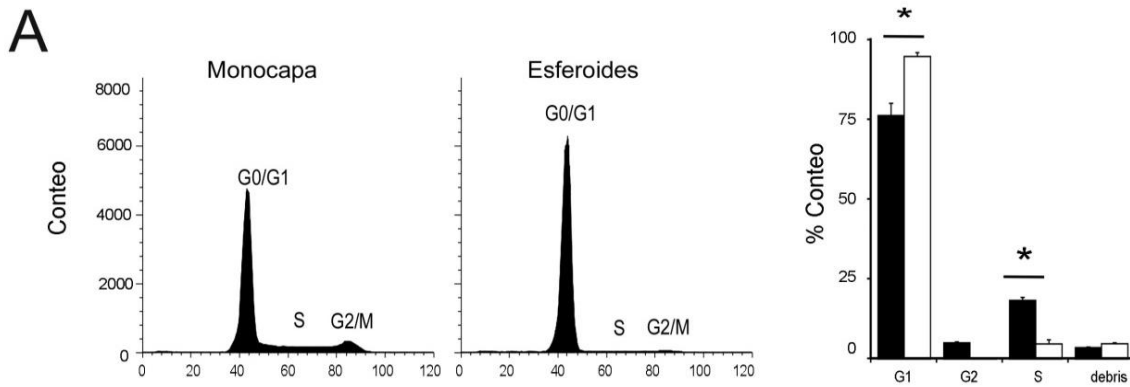
^b NaCN fue adicionado para inhibir completamente el consumo de oxígeno mitocondrial.

^c La FO se determinó con la diferencia entre la tasa de respiración basal y las tasa de consumo de oxígeno en presencia de oligomicina.

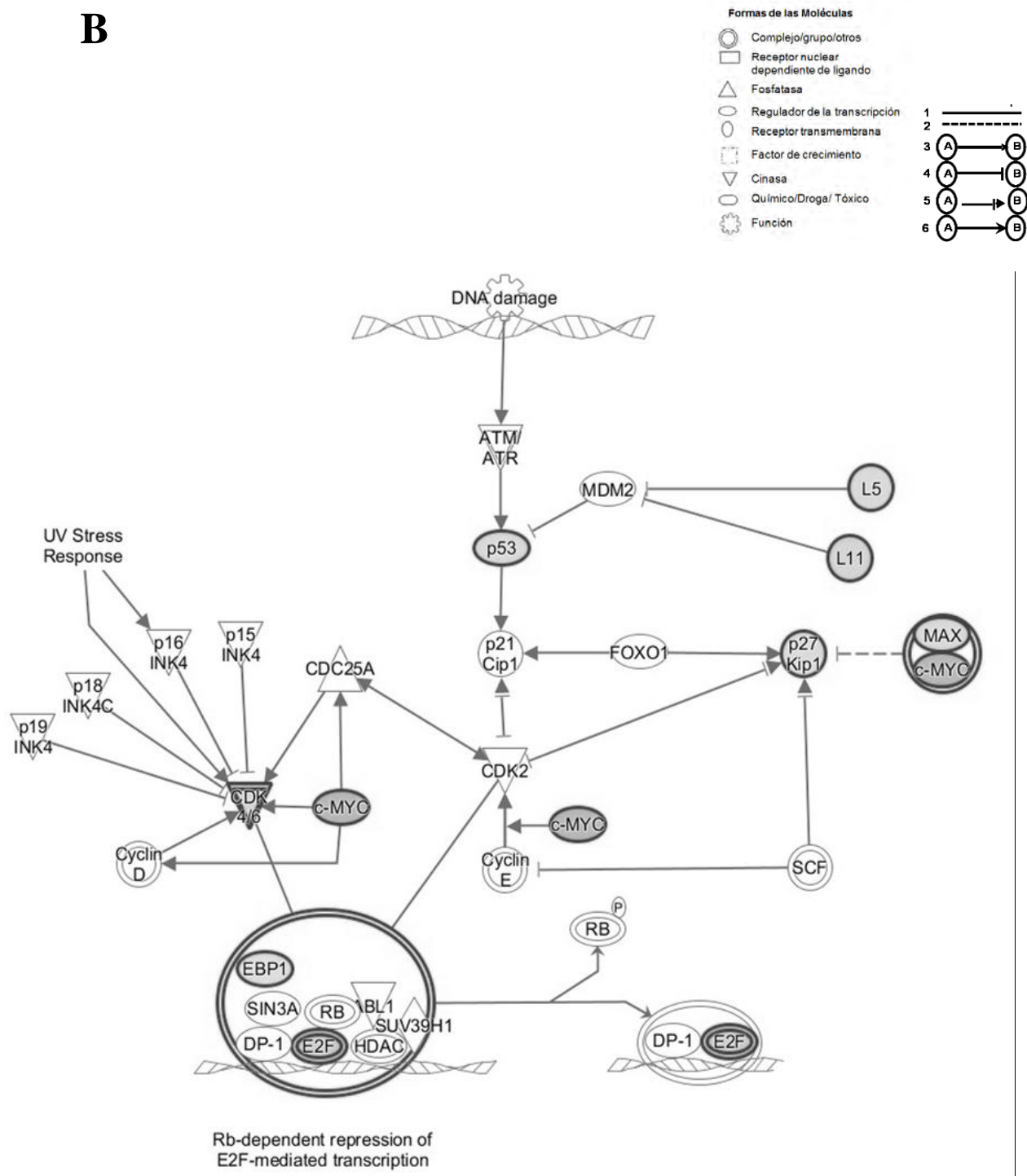
^d Respiración no acoplada (U) fue inducida con 6 mM CCCP.

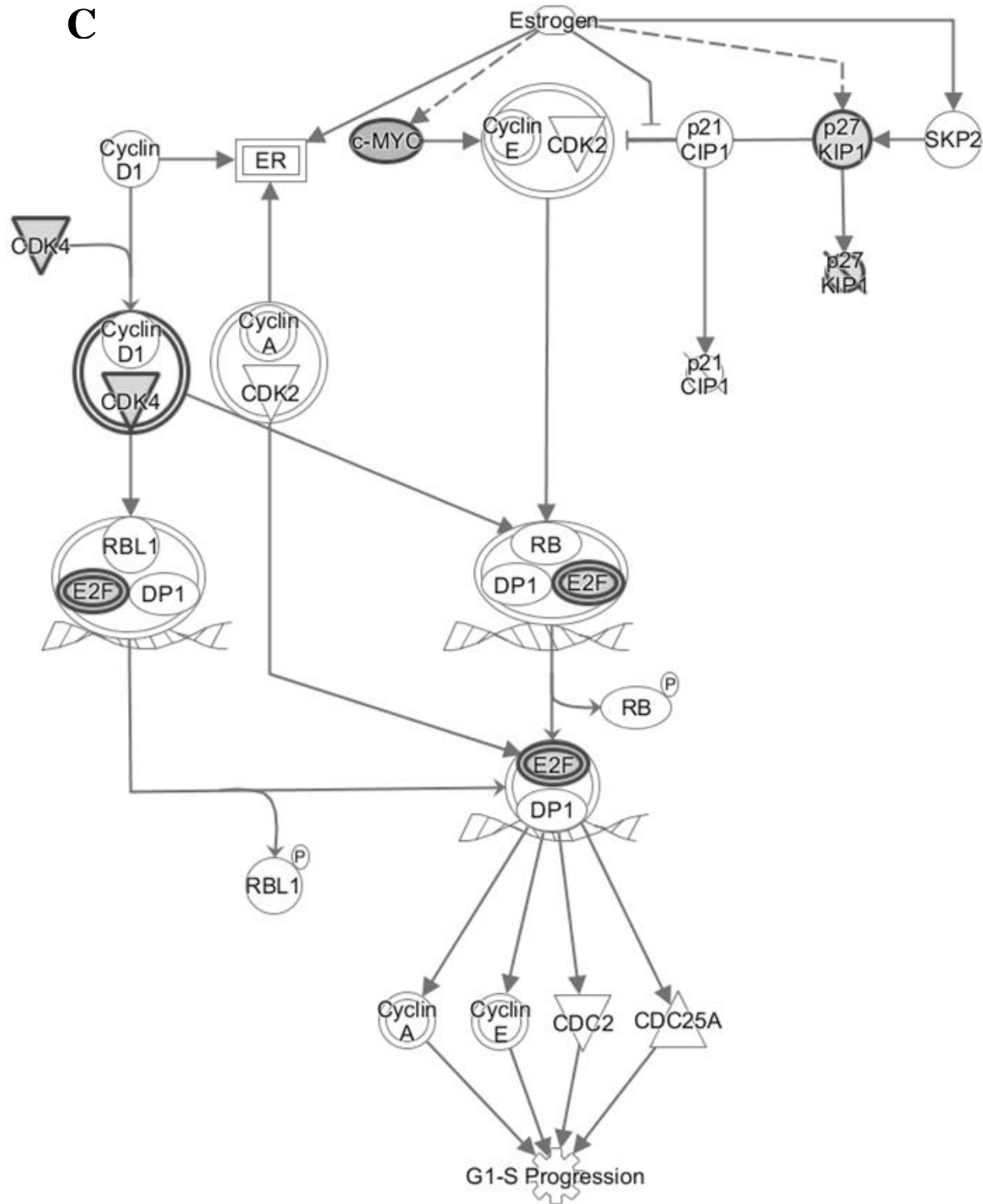
VI. Análisis del ciclo celular en células MCF-7 cultivadas en monocapa y MTS.

Cuando se analizaron los mRNAs diferencialmente expresados con el programa IPA, se encontraron varias vías de señalización canónicas relacionadas con las fases del ciclo celular. Para determinar que fases del ciclo celular se encontraban en los esferoides de seis días de cultivo *versus* células en monocapa, se analizó el DNA por medio de citometría de flujo, mostrando que los MTS fueron arrestados en la fase del ciclo G0/G1 principalmente y las células en fase de síntesis (S) disminuyeron en comparación con células en monocapa. La fase de G2/M en ambos cultivos fue marcadamente disminuida en comparación con las otras fases del ciclo, presentando un 5.14% en monocapa *vs* 0.24% en MTS (Figura 11A). Los genes candidatos que podrían estar regulando este fenotipo en MTS son Tp53, cMYC, p27KIP1 (CDKN1B), MAX/cMyc y CDK4 que fueron involucrados en las vías de regulación del ciclo celular G1/S checkpoint (Figura 11B y Tabla 4), estrógeno regula la fase S (Figura 11C y Tabla 4) y señalización de PI3K/AKT principalmente (Figura 11D y Tabla 4)



B





D

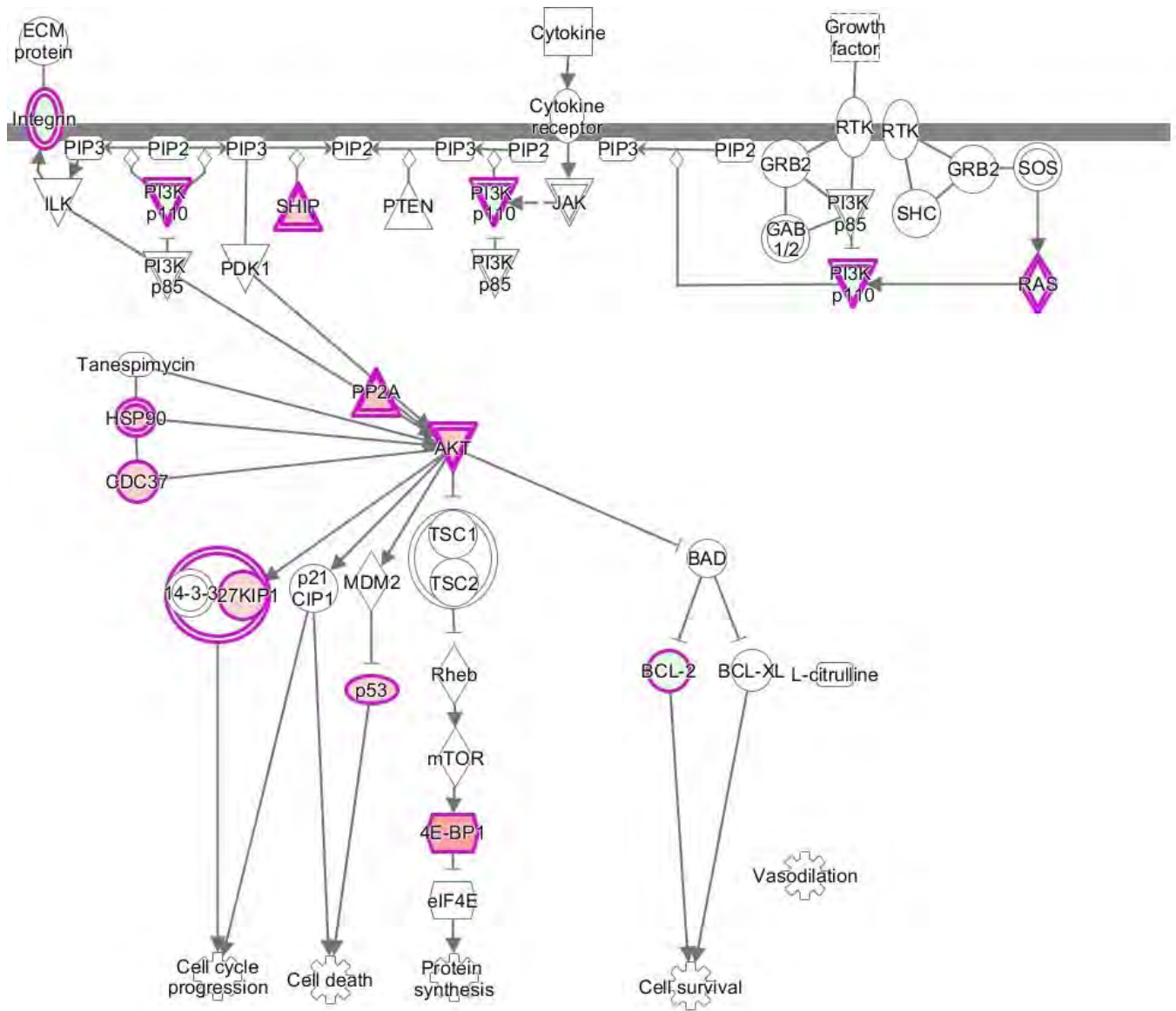


Figure 11. Análisis del ciclo celular en MTS *versus* monocapa usando citometría de flujo y el programa IPA. **(A)** Fases del ciclo celular en monocapa y esferoides de seis días de cultivo, **(B)** Regulación de la fase G1/S checkpoint (IPA), **(C)** Estrógeno regula la fase S (IPA) y **(D)** Señalización vía PI3K/AKT (IPA). **Relaciones:** 1; Directa, 2; Indirecta interacción, 3; Activación, expresión, inhibición, modificación, fosforilación, escisión molecular e interacción proteína-proteína, 4; Inhibición y/o ubiquitinación, 5; Inhibición y/o actúa sobre, 6; Reacción. Las moléculas marcadas en color gris y en rosa fueron inducidas y en verde moléculas reprimidas, la intensidad del color indica la magnitud de cambio. * $p < 0.05$, $n = 3$ prueba *t*-student.

VII. Análisis de los RNAs no codificantes largos (lncRNAs).

En la figura 12A y B se muestran los 1502 lncRNAs que fueron diferencialmente expresados, un número muy similar al de los mRNAs con 1122 transcriptos (Figura 12C). Sin embargo, 778 de los 1502 lncRNAs fueron expresados en una sola condición de cultivo pero no en ambas. Donde, 390 lncRNAs solo se expresaron en MTS y un número muy similar con 398 lncRNAs solo se detectaron en cultivos en monocapa (Figura 12B). Por lo que, el 58% de los lncRNA totales fueron regulados positivamente (inducidos) (Figura 12B y C) y el 42% fue regulado negativamente en MTS de seis días de cultivo (Figura 12B y C). En comparación con los mRNAs donde el 82% fue inducido y el 18% fue reprimido en MTS (Figura 12C).

Cuando se comparó la distribución del fold-change entre mRNAs y lncRNAs diferencialmente expresados, encontramos que los mRNAs presentaron un rango de fold-change entre -42 a 18. Sin embargo, el fold-change de los lncRNAs se encontró entre -15 a 59 veces (Figura 12D). Es decir, que los lncRNAs inducidos presentaron una expresión tres veces mayor que los mRNAs. Además, cerca de la mitad de estos lncRNAs fueron regulados de manera binaria es decir, se expresaron únicamente en MTS y otros solo se detectaron en monocapa (Figura 12B). El fold-change menor fue de -2 y 2 tanto de los genes lncRNA y mRNAs inducidos y reprimidos (Figura 12D).

Con respecto a la distribución del tamaño de los lncRNAs esta fue desde los 200 a 20,000 nt, de los cuales el 60% (906) tuvieron una longitud menor a 1000 nt, el 27% (403) se encontró entre los 1000 a 2499 nt, el 12% (172) fue mayor a los 2500 nt. y solo 20 lncRNAs tuvieron un tamaño entre 5000 a 9999, encontrando un solo transcrito de 19000 nt (Figura 12E). En particular, no se encontró una diferencia en el sentido de la cadena de DNA donde fueron transcriptos los lncRNAs dado que 767 lncRNAs se originaron de la cadena positiva y 735 de la cadena negativa. Estos resultados fueron similares a los reportados en las bases de datos (<http://www.ensembl.org/index.html>) para los lncRNAs

(con 58,271 transcritos a partir de la cadena positiva y 53, 339 de la cadena negativa). Donde la prueba de Chi-cuadrada fue igual a 0,0011 grados de libertad con un valor de $p=0.98$.

Finalmente, se identificaron los 20 genes lncRNAs diferencialmente expresados en MTS de forma positiva y negativa en base a los valores de fold-change mayores (10 reprimidos y 10 inducidos) donde los lncRNA-TCL1B-1:1 y lncRNA-FCGR1B-1:1 mostraron una mayor alteración con un fold-change de 59 y -15 respectivamente (Figura 12F).

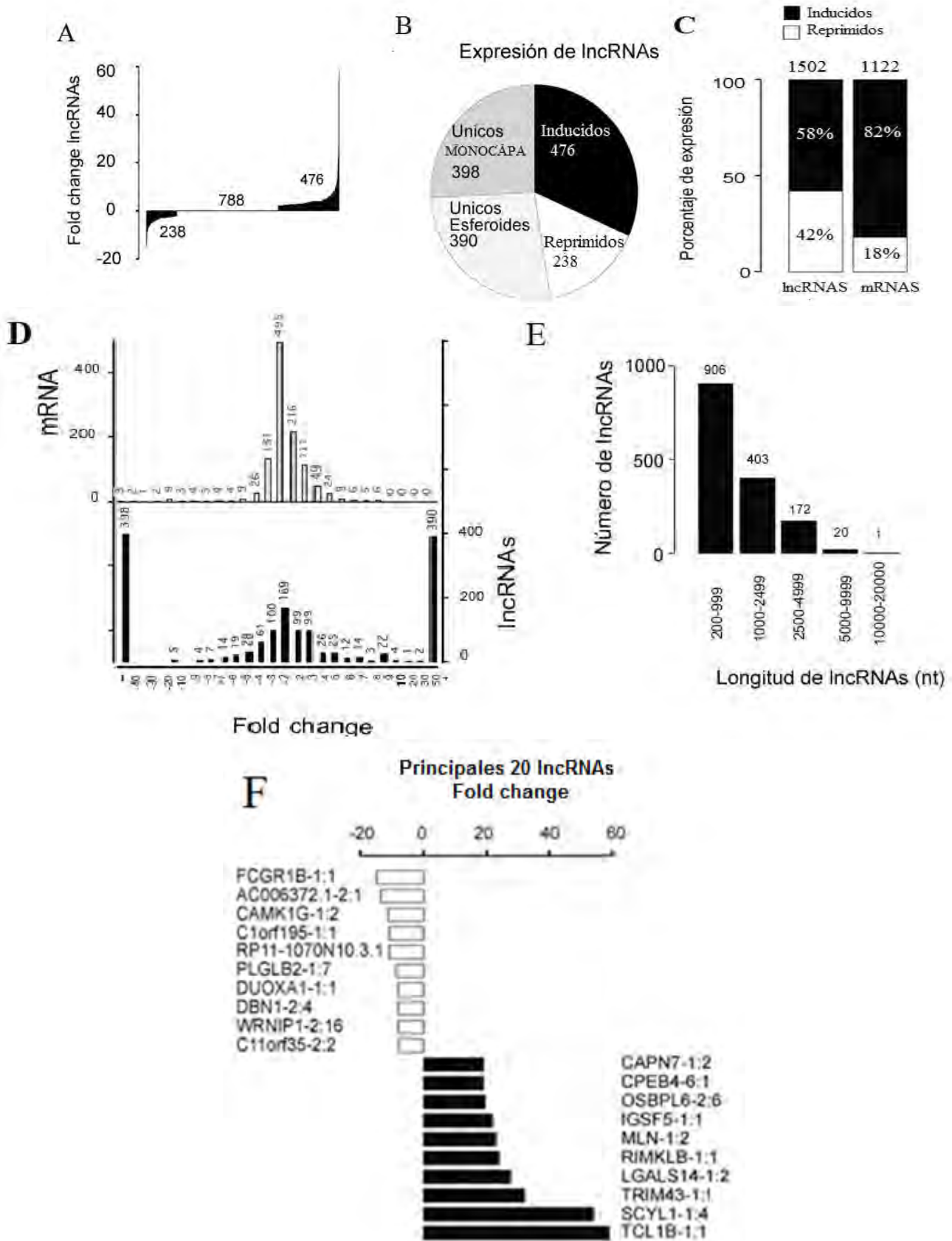


Figura 12. Análisis de los lncRNAs en MTS *versus* monocapa, usando RNAseq. **(A)** Fold-change de todos los lncRNAs, así como la representación de lncRNAs que fueron expresados en una sola condición de cultivo, monocapa o MTS pero no en ambas (fold- change = 0). **(B)** El diagrama de pastel muestra el número de los lncRNAs inducidos y reprimidos en esferoides incluyendo por separado los lncRNAs expresados en una sola condición de cultivo. **(C)** Comparativo de los porcentajes de expresión de genes inducidos y reprimidos en esferoides (lncRNAs and mRNAs). **(D)** Histograma comparativo, que muestra la distribución del fold-change entre lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados. **(E)** Distribución de la longitud de los lncRNAs diferencialmente expresados. **(F)** Los 20 genes alterados con mayor fold-change (10 inducidos y 10 reprimidos en esferoides).

VIII. Validación de los lncRNAs y mRNAs expresados diferencialmente en cultivos de monocapa y esferoides.

Se validaron 7 lncRNAs y 8 mRNAs por qRT-PCR, se consideró el 100 % del total de genes para cada grupo y con ello se calculó la eficiencia haciendo una regla de tres, en base a los valores y el patrón de expresión obtenidos por qRT-PCR, estos deberían ser similares al que mostraron en la secuenciación y que además las diferencias de cambio fueran estadísticamente significativos. Se obtuvo una eficiencia del 75% para los mRNAs y un 85 % para los lncRNAs con respecto a la RNAseq, los genes mRNAs y lncRNAs que se validaron se muestran en las Figura 13A y B respectivamente. En la tabla 6 se muestran los valores de expresión relativa de cada gen obtenido por qRT-PCR y RNAseq, así como los valores de significancia.

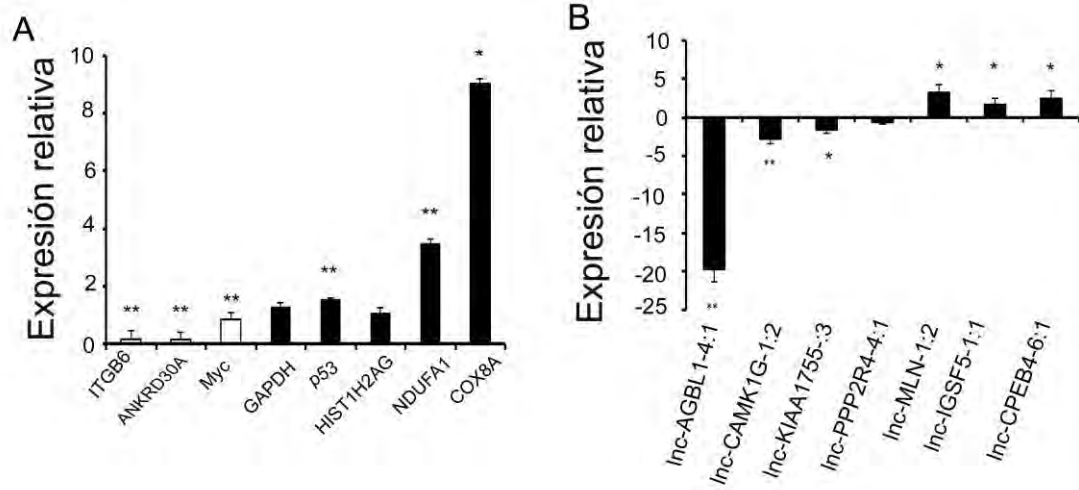


Figure 13. Validación de los lncRNAs y mRNAs por qRT-PCR. (A y B) Expresión relativa genes suprimidos e inducidos, mRNAs y lncRNAs (respectivamente) validados por qRT-PCR y normalizados con TBP gen. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

Tabla 6. Validación por qRT-PCR de los cambios de expresión génica identificados por secuenciación masiva (RNA-seq).

GEN	Expresión relative		p-valor qRT-PCR	Método de qPCR
	qRT-PCR	RNA-seq		
lnc-AGBL1-4:1	-19.69 ± 1.68	-5.1	0.001	Curva estándar relativa
lnc-CAMK1G-1:2 (MIR205HG-001)	-2.77 ± 0.65	-11.3	0.001	Curva estándar relativa
lnc-PPP2R4-4:1	-1.57 ± 0.51	-3.1	0.042	Curva estándar relativa
lnc-KIAA1755-5:3	0.57 ± 0.33	-4.0	0.265	Curva estándar relativa
lnc-MLN-1:2	3.24 ± 1.12	23	0.022	Curva estándar relativa
lnc-IGSF5-1:1	1.75 ± 0.70	22	0.015	Curva estándar relativa
lnc-CPEB4-6:1	2.44 ± 1.02	19	0.030	Curva estándar relativa
ITGB6	0.15554072 ± 0.30	-10.52	0.00147	2 $\Delta\Delta C_T$
ANKRD30A	0.144032353 ± 0.23	*	0.00001	2 $\Delta\Delta C_T$
MYC	0.84319542 ± 0.22	4.4	0.0007	2 $\Delta\Delta C_T$
GAPDH	1.292590582 ± 0.15	2.65	0.406	2 $\Delta\Delta C_T$
p53	1.555923172 ± 0.06	2.30	0.0015	2 $\Delta\Delta C_T$
HIST1H2AG	1.076666667 ± 0.17	4.49	0.06	2 $\Delta\Delta C_T$
NDUFA1	3.494077936 ± 0.15	5.8	0.0008	2 $\Delta\Delta C_T$
COX8A	9.030698223 ± 0.16	5.74	0.013	2 $\Delta\Delta C_T$

*Expresión identificada solo en cultivos en monocapa.

IX. Distribución de los mRNAs y lncRNAs diferencialmente expresados por cromosoma.

En la figura 14A se muestra la distribución de los mRNAs y lncRNAs diferencialmente expresados por cromosoma. No se encontró una correlación entre el número de transcritos y la longitud de cada cromosoma, tanto en mRNAs como en los lncRNAs ($R=0.55$ y $R=0.69$ respectivamente). Sin embargo, cuando se correlacionó el número de RNAs diferencialmente expresados *versus* el número de todos los RNAs descritos por cromosoma (densidad), solamente en mRNAs se encontró una correlación ($R=0.95$), en los lncRNAs no la hubo ($R=0.67$) (Figura 14C).

Si bien ambos grupos de transcritos mRNAs y lncRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II principalmente, entre otras similitudes y el número de RNAs codificantes es muy similar al de los lncRNAs en cada cromosoma de acuerdo a lo reportado por Ensembl (<http://www.emsembl.org/index.html>) (Figura 14B). Nosotros, identificamos un patrón diferente en la distribución de los RNAs por cromosoma, dado que en la mayoría de los casos el número de lncRNAs fue mayor al de mRNAs (Figura 14A).

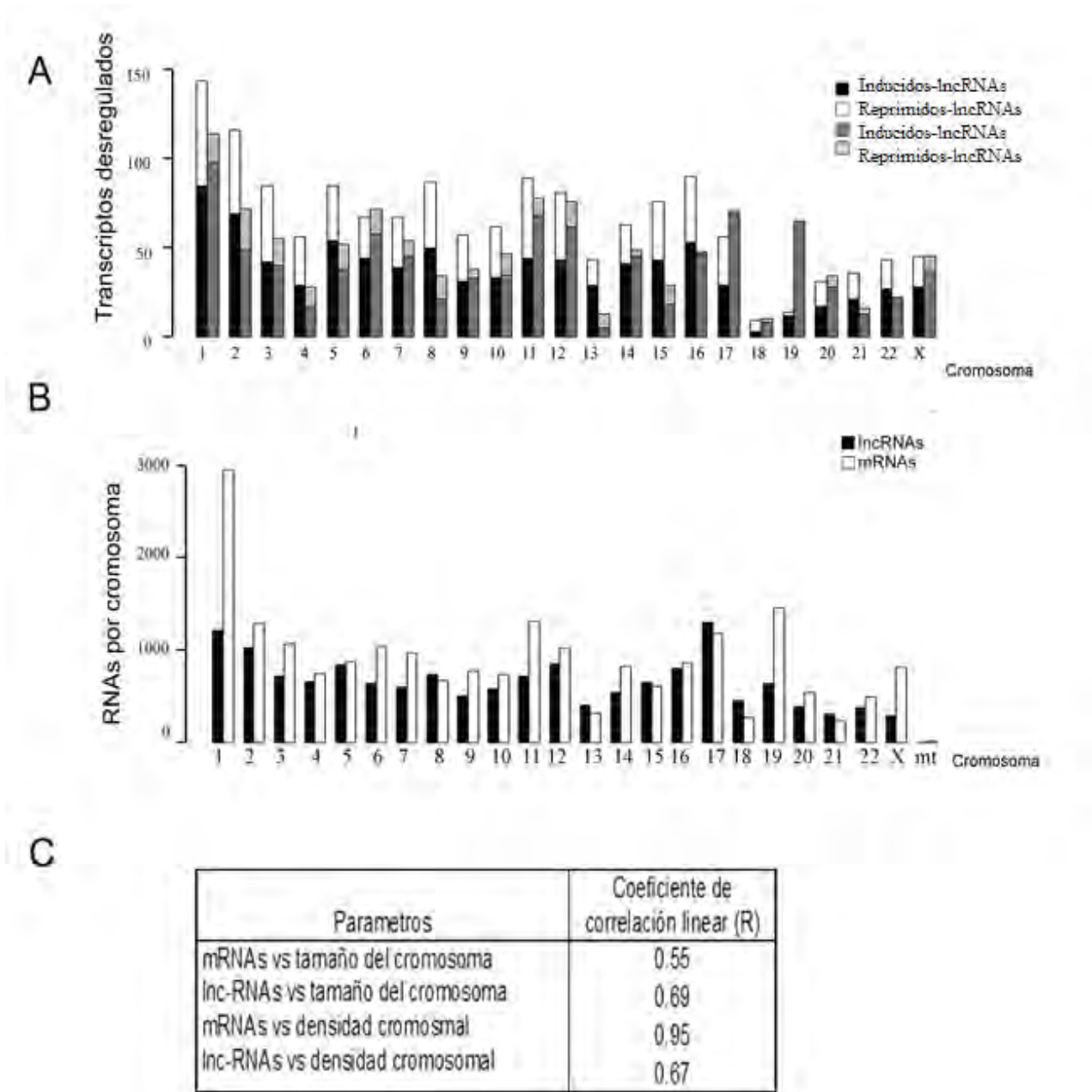


Figure 14. Distribución de los lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados por cromosoma. (A) Número de mRNAs y lncRNAs inducidos- reprimidos por cromosoma (B) Total de lncRNAs y mRNAs reportados por cromosoma en Ensembl (<http://www.emsembl.org/index.html>). (C) Coeficiente de correlación lineal (R) de mRNAs y lncRNAs de acuerdo a la longitud o densidad cromosomal.

X. Análisis de la relación posicional entre los lncRNAs y sus mRNAs adyacentes

Cerca de la mitad de RNAs no codificantes largos de la clase intergénicos son transcritos cerca (a menos de 10Kb) de genes que codifican para proteínas, éstos tal vez representan los mejores candidatos para el estudio de la regulación transcripcional de genes vecinos (Ponting CP, Oliver PL, y Reik W 2009). La relación posicional entre lncRNA y mRNA en el genoma es importante para poder predecir en algunos casos si dicho lncRNAs está regulando a uno o varios genes mRNAs vecinos (Song X et. al., 2014). Por esta razón, se realizó una co-relación entre lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados de acuerdo con el nombre del gen (mRNA y lncRNAs), se encontraron 63 co-expresiones (Figura 15A). En la tabla 7, se muestran los 63 lncRNAs y mRNAs co-regulados, incluyendo su fold-change y ubicación cromosómica, así como las isoformas de algunos lncRNAs. De los cuales 35 lncRNAs se co-regularon de manera positiva con su mRNAs vecino, es decir en ambos casos su expresión estaba inducida (Figura 15B). Uno de los más interesantes fue el gen PMP22 (la proteína periférica de la mielina 22) que es uno de los primeros genes identificados por su función específica de arresto celular y que se ha asociado a cáncer de mama (Winslow S, Leandersson K y Larsson C 2013). De forma contraria, dos lncRNAs fueron regulados de manera negativa con su mRNA vecino, es decir que tanto la expresión del mRNA como del lncRNA fue suprimida, teniendo a CHD2 (Helicasa con crodominio de unión a DNA 2) y LRBA (por sus siglas en inglés lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor) este último gen se ha asociado con cáncer de mama con una tendencia en los de tipo positivos para el receptor de estrógeno (Wang JW et al., 2004) (Figura 15B). Sin embargo, 20 lncRNAs presentaron un patrón inverso de co-regulación, es decir que cuando la expresión de uno de ellos estaba reprimida la del otro estaba inducida o viceversa (Figura 15C). También se encontraron 5 lncRNA que fueron co-regulados pero con dos mRNAs vecinos que también estaban diferencialmente expresados (lncRNA-ADI1-2:1, lncRNA-HIST1H2AG-2:1, lncRNA-HIATL1-4:1, lncRNA-ARL15-1:1 y lncRNA-GGCT-1:21) (Figura 16A) y por último el

lncRNA-GAPDH quien presentó una co-regulación con tres genes mRNAs vecinos GAPDH, NOP2 y MRPL51 este último gen aún no se ha relacionado con cáncer de mama (Nicholls C et al., 2012 y McGrath PC et al., 1994) (Figura 16A).

En paralelo se identificaron otras familias de genes mRNAs y sus vecinos lncRNAs, encontrando dos familias o cluster de mRNAs localizados en el cromosoma 1 y 6, el primero incluye 4 tipos de histonas que están alrededor de varios lncRNAs (Figura 16B). El segundo cluster con 25 genes de histonas que incluyen a la familia de HISTH2, HISTH3 y HISTH4 y sus lncRNAs vecinos cercanos (ej., lnc-ZNF192-1:1, lnc-HIST1H2AG-2:1, lnc-HMGN4-1:1, lnc-PRL-7:1, etc.) (Figura 16B). De forma aislada se localizó un gen de histona HIST4H4 ubicada en el cromosoma 12 y sus lncRNAs vecinos (Figura 16B).

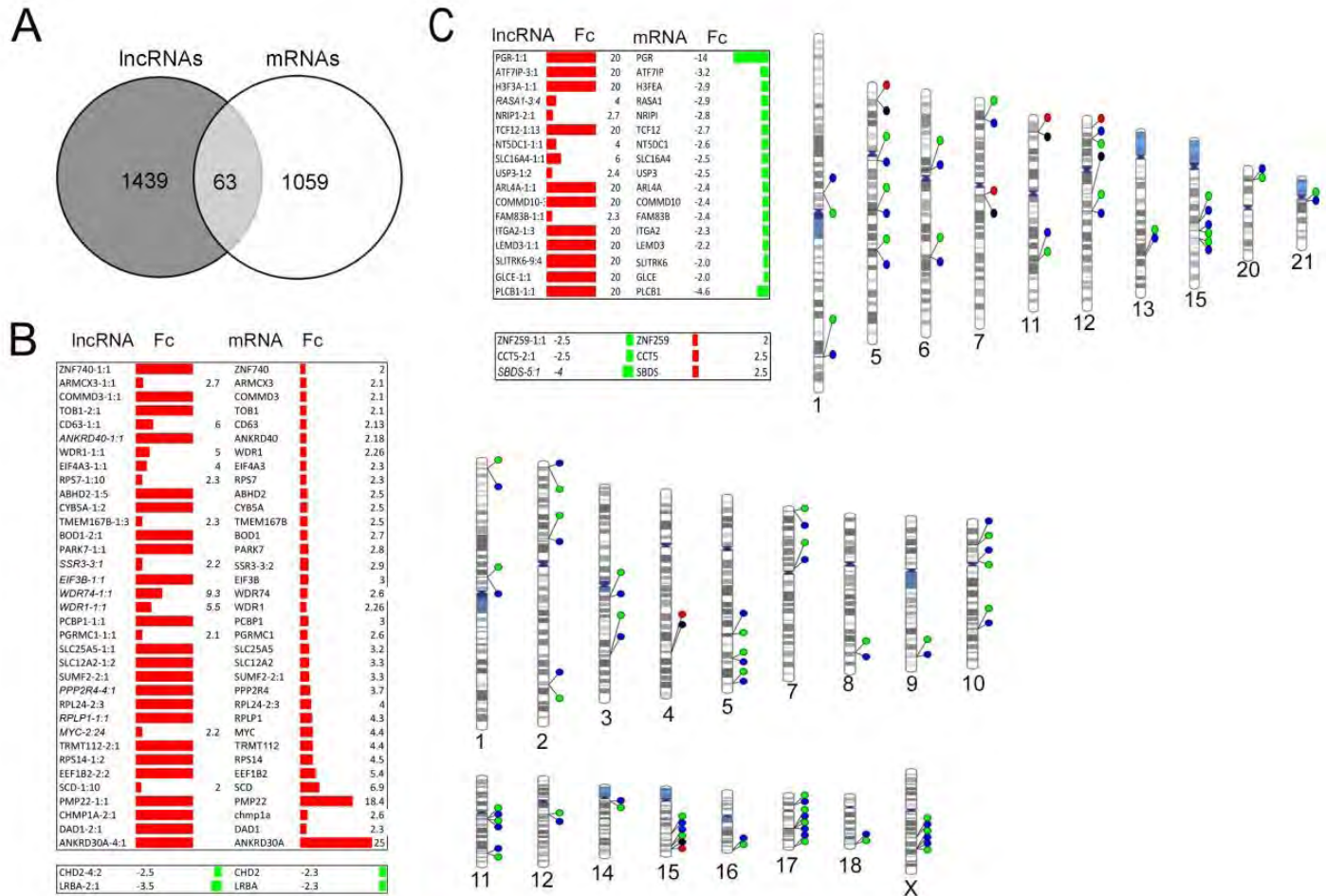
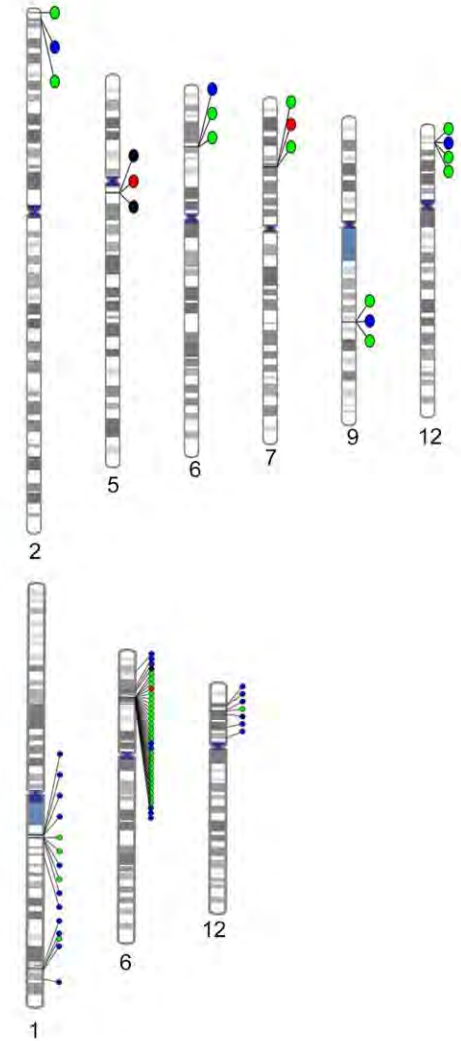


Figura 15. Relación posicional entre lncRNAs y sus mRNAs adyacentes en MTS. **(A)** Diagrama de Venn de los 63 lncRNAs y mRNAs co-regulados de acuerdo a su nombre en la base de datos de LNCipedia (<http://lncipedia.org/>), isoformas de los lncRNAs no incluidas. **(B)** lncRNAs y mRNAs co-regulados de manera positiva (Inducidos en ambos casos) o bien lncRNAs y sus vecinos mRNAs co-regulados de manera negativa (reprimidos en ambos casos) y sus respectivos fenogramas. **(C)** lncRNAs y su vecinos mRNAs co-regulados de forma opuesta (reprimidos e inducidos) y sus respectivo fenograma.

A

lncRNA	Fc	mRNA	Fc	mRNA	Fc	mRNA	Fc
AD1-2:1		20 TRAPPC12		3.11 AD1L		2.9	
HIST1H2AG-2:1		8 HIST1H2AG-2:1		4.5 HIST1H2BJ		3.8	
HIATL1-4:1		3.9 FBP1		2.6 HIATL1-4:1		-2.5	
ARL15-1:1		20 ARL15		-4.6 NDUFS4		-2.5	
GGCT-1:21		-7 GARS		3.2 GGCT		3.2	
GAPDH-2:1		20 GAPDH		2.6 NOP2		2.8 MRPL51	3.1



B

RNA /Cromosoma 6	Posición	FC	RNA/Cromosoma 1	Posición	FC
lnc-TRIM26-2	30287397	11	lnc-TARBP1-4:1	234212606	2
lnc-TRIM27-10	28837869		lnc-NUP133-1:1	229440284	4.0
lnc-ZNF192-1	28136849		HIST3H2BB	228458107	5
HIST1H2BO	27893463	2	lnc-JMJD4-1:2	227743831	4.0
HIST1H2AM	27892757	4	lnc-H3F3A-1:1	226083639	
HIST1H3J	27890382	3	lnc-KCNJ9-2	159961218	
HIST1H3I	27871905	4	lnc-ECM1-1	150515757	8
HIST1H2AJ	27814354	2	HIST2H2AB	149887524	2
HIST1H3H	27810064	4	lnc-HIST2H2AA3-1	149844498	2
HIST1H2AI	27808199	6	HIST2H2BE	149842204	2
HIST1H2BL	27807444	3	HIST2H3D	149813271	3
HIST1H2BK	27146418	4	lnc-GPR89B-7	148415197	4
HIST1H2AG	27133042	4	lnc-GPR89B-5	148295180	
HIST1H2BJ	27125897	4			
lnc-HIST1H2AG-2	26956992	8			
lnc-HMGN4-1	26527063				
HIST1H3G	26269405	4			
HIST1H3F	26250195	4			
HIST1H2AE	26216975	2			
HIST1H2BG	26216066	4			
HIST1H4E	26204645	4			
HIST1H3D	26196840	3			
HIST1H2BD	26158146	3			
HIST1H2AC	26124145	4			
HIST1H2BC	26114873	6			
HIST1H4C	26103876	3			
HIST1H3C	26045411	-2			
HIST1H3B	26031650	5			
HIST1H4B	26026815	5			
HIST1H4A	26021679	6			
lnc-PRL-7	22744395	-2			
lnc-SOX4-1	21664772				
lnc-MBOAT1-2	19802164				

RNA/Chromosome 12	Position	FC
lnc-GAPDH-2:1	30978308	
lnc-CDK2AP1-1:4	24566964	3.0
lnc-MGST1-1	16693800	-3.5
HIST4H4	14767999	2
lnc-ATF7IP-3	14216590	
lnc-ETV6-1	11548030	
lnc-PRB1-1	11399381	

Figure 16. Relación posicional entre lncRNAs y sus mRNAs adyacentes en MTS usando el programa IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institutes). **(A)** lncRNAs con más de un mRNAs vecino y su correspondiente fenograma. **(B)** Familia o cluster de histonas mRNAs y sus lncRNAs vecinos y su correspondiente fenograma.

Tabla 7. Relación entre los 63 lncRNAs y mRNA adyacentes, se incluyen las isoformas de los lncRNAs.

Símbolo mRNA	Nombre del gen	Fold change	Símbolo lncRNA	Fold change	Localización lncRNA	Localización mRNA	Cromosoma
ABHD2	Abhydrolase domain containing 2	2.5	ABHD2-1:5	**	89584454-89626050	89631381-89745591	15
ADII	Acireductone dioxygenase 1	3.0	ADII-2:1	**	3302112-3305236	3501690-3523350	2
ANKRD30A	Ankyrin repeat domain 30A	*	ANKRD30A-4:1	*	37229037-37232860	37414785-37521495	10
ANKRD40	Ankyrin repeat domain 40	2.2	ANKRD40-1:1	*	48840212-48844918	48770551-48785270	17
			ANKRD40-1:5	*	48838535-48844877		17
ARL15	ADP-ribosylation factor-like 15	-4.6	ARL15-1:1	*	53072474-53115516	53180614-53606403	5
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	-2.0	ARL4A-1:1	*	13141016-13142014	12726452-12730559	7
ARMCX3	Armadillo repeat containing, X-linked 3	2.1	ARMCX3-1:1	2.7	100882858-100883508	100878120-100882831	X
ATF7IP	Activating transcription factor 7 interacting protein	-3.2	ATF7IP-3:1	**	14369524-14374231	14518611-14651697	12
BOD1	Biorientation of chromosomes in cell division 1	2.7	BOD1-2:1	*	173217812-173236042	173034148-173043666	5
CCT5	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	2.2	CCT5-2:1	-2.5	10137250-10138477	10250282-10266501	5
CD63	CD63 molecule	2.1	CD63-1:1	6.0	56155334-56156412	56119230-56122910	12
CHD2	Chromodomain helicase DNA binding protein 2	-2.4	CHD2-4:2	-2.5	93855786-94098099	93443551-93571237	15
CHMP1A	Chromatin modifying protein 1A	2.6	CHMP1A-2:1	*	89458783-89478972	89710843-89724129	16
COMMD10	COMM domain containing 10	-2.4	COMMD10-3:1	**	115910178-115927094	115420727-115628978	5
COMMD3	COMM domain containing 3	2.1	COMMD3-1:1	*	22546715-22547477	22605312-22609246	10
CYB5A ⁴	Cytochrome b5 type A (microsomal)	2.6	CYB5A-1:2	*	71878626-71879804	71920527-71959251	18
DAD1	Defender against cell death 1	2.4	DAD1-2:1	**	22849083-22951948	23033807-23058143	14
EEF1B2	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	5.4	EEF1B2-2:2	**	206950246-206950880	207024318-207027653	2
EIF3B ¹	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	3.1	EIF3B-1:1	**	2423756-2428232	2394474-2420380	7

Expresión diferencial de los RNAs no codificantes largos, entre cultivos en monocapa y esferoides de MCF-7

EIF4A3 ¹	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 3	2.3	EIF4A3-1:1	4.0	77965743-77966640	78109013-78120982	17
FAM83B	Family with sequence similarity 83, member B	-2.4	FAM83B-1:1	2.3	54807965-54809897	54711569-54806820	6
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6	2.7	GAPDH-2:1	**	6619441-6619688	6643657-6647536	12
GGCT	Gamma-glutamyl cyclotransferase	3.2	GGCT-1:21	-7.0	30555925-30602441	30536237-30544457	7
GLCE	Glucuronic acid epimerase	-2.0	GLCE-1:1	**	69571014-69580903	69452973-69564544	15
H3F3A	H3 histone family 3A	-2.9	H3F3A-1:1	*	226274582-226277993	226250408-226259703	1
HIATL1	Hippocampus abundant transcript-like 1	-2.5	HIATL1-4:1	3.9	97320996-97330312	97136833-97223202	9
HIST1H2AG	Histone cluster 1, H2AG	4.5	HIST1H2AG-2:1	8.0	26988232-26991703	27100817-27101314	6
ITGA2 ⁷	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	-2.3	ITGA2-1:3	*	52405707-52410027	52285156-52390609	5
LEMD3	LEM domain containing 3	-2.2	LEMD3-1:1	**	65675437-65680508	65563351-65642141	12
LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing	-2.3	LRBA-2:1	-3.5	150509142-150817385	151185594-151936649	4
MYC ³	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	4.4	MYC-2:24	*	129001463-129108824	128748315-128753680	8
			MYC-2:5	**	128806806-128951855		
			MYC-2:8	4.5	128808059-128903041		
			MYC-2:9	2.2	128808066-128903206		
NRIP1	Nuclear receptor interacting protein 1	-2.8	NRIP1-2:1	2.7	16742841-16774624	16333556-16437126	21
NT5DC1	5'-nucleotidase domain containing 1	-2.7	NT5DC1-1:1	4.0	116575370-116577906	116421999-116566853	6
PARK7 ⁶	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	2.8	PARK7-1:1	*	8086798-8182762	8021714-8045342	1
PCBP1	Poly(rC) binding protein 1	3.0	PCBP1-1:1	**	70316853-70323232	70314585-70316335	2
PGR	Progesterone receptor	-14.0	PGR-1:1	**	100554893-100558686	100900355-101000544	11
PGRMC1	Progesterone receptor membrane component 1	2.6	PGRMC1-1:1	2.1	118425492-118469573	118370211-118378429	X

Expresión diferencial de los RNAs no codificantes largos, entre cultivos en monocapa y esferoides de MCF-7

PLCB1	Phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-4.6	PLCB1-1:1	**	8000549-8008603	8113296-8865547	20
PMP22	Peripheral myelin protein 22	18.4	PMP22-1:1	**	15170778-15175607	15133096-15168644	17
PPP2R4 ⁵	Protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	3.7	PPP2R4-4:1	-3.1	132083295-132087184	131873228-131911225	9
			PPP2R4-5:1	*	132094579-132101180		
			PPP2R4-5:3	-5.4	132099158-132109743		
			PPP2R4-5:4	-3.0	132104122-132121817		
PSME1	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	3.0	PSME1-1:2	3.1	24608654-24609653	24605378-24608176	14
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	-3.0	RASA1-3:4	4.0	87564841-87581884	86564151-86687733	5
			RASA1-3:9	3.8	87564864-87583473		
RPL24 ²	Ribosomal protein L24	4.0	RPL24-2:3	**	102382007-102392757	101399934-101405563	3
RPLP1 ²	Rbosomal protein, large, P1	4.4	RPLP1-1:1	**	69755365-69857576	69745159-69747884	15
			RPLP1-1:11	**	69854062-69863422		
			RPLP1-1:18	10.0	69857531-69863775		
			RPLP1-1:9	**	69850531-69863422		
RPS14 ¹	Ribosomal protein S14	4.5	RPS14-1:2	**	149855094-149865531	149823792-149829319	5
RPS7 ¹	Ribosomal protein S7	2.3	RPS7-1:10	2.3	3606168-3609321	3622853-3628509	2
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome pseudogene	2.5	SBDS-5:1	-4.0	65956996-65958553	66452690-66460588	7
			SBDS-5:2	-2.9	65956083-65958525		
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	7.0	SCD-1:10	2.0	102133372-102143125	102106772-102124588	10
SLC12A2	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	3.3	SLC12A2-1:2	**	127270935-127277199	127419483-127525380	5
SLC16A4	Solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5)	-2.5	SLC16A4-1:1	6.0	110828997-110881793	110905473-110933704	1
SLC25A5	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	3.2	SLC25A5-1:1	**	118556880-118557510	118602363-118605359	X

SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	-2.1	SLITRK6-9:4	*	88096247-88323218	86366922-86373483	13
SSR3	Signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	2.9	SSR3-3:1 SSR3-3:2	** 2.2	156470852-156534851 156465135-156534823	156257929-156272973	3
SUMF2	Sulfatase modifying factor 2	3.3	SUMF2-2:1	**	56560817-56564978	56131917-56148365	7
TCF12	Transcription factor 12	-2.7	TCF12-1:13	*	57592563-57599959	57210833-57580716	15
TMEM167B	Transmembrane protein 167B	2.5	TMEM167B-1:3	2.3	109642815-109643234	109633403-109639554	1
TOB1	Transducer of ERBB2, 1	2.1	TOB1-2:1	*	48986998-48987593	48939584-48941413	17
TRMT112	tRNA methyltransferase 11-2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>); similar to CG12975	4.4	TRMT112-2:1	*	64161814-64163303	64084163-64085033	11
USP3	Ubiquitin specific peptidase 3	-2.5	USP3-1:2	2.4	63682429-63729347	63796810-63883663	15
WDR1	WD repeat domain 1	2.3	WDR1-1:1	5.0	10069713-10074643	10075963-10118573	4
WDR74	WD repeat domain 74	2.6	WDR74-1:1 WDR74-1:12 WDR74-1:14 WDR74-1:22 WDR74-1:25 WDR74-1:4	9.3 6.0 2.5 2.5 -2.3 -2.3	62619730-62623386 62621840-62622960 62620826-62622960 62619460-62622708 62619520-62621168 62619460-62623339	62600383-62607628	11
ZNF259	Zinc finger protein 259	2.2	ZNF259-1:1	-2.5	116645826-116646592	116649276-116658739	11
ZNF740	Zinc finger protein 740	2.0	ZNF740-1:1	**	53553370-53554784	53574535-53584654	12

* Genes que se expresaron solamente en monocapa, ** Genes que se expresaron solamente en MTS, ^{1,2} Genes de la vía de EIF2, ¹ Genes de la vía de mTOR, ^{1,5,7} Genes de la vía de regulación de EIF4 y p70S6K, ³ Genes de la vía de ciclo celular : G1/S Checkpoint y estrógeno regula la fase S, ^{4,6} Genes de la vía de disfunción mitocondrial y fosforilación oxidativa, ^{5,7} Genes de la vía de PI3K/AKT.

DISCUSIÓN

La llamada resistencia multicelular podría considerarse como uno de los obstáculos principales en el tratamiento del cáncer (Jones VS et al., 2015). Dicha resistencia surge en cuanto las células han establecido contacto con su microambiente que incluye la matriz extracelular, células heterologas y células homologas principalmente. Una relevancia de las células que crecen como esferoides es que secretan una mayor matriz extracelular y la resistencia al parecer está regulada por los receptores de membrana E-cadherina e integrinas principalmente, dado que una vez que la célula pierde este tipo de contacto la resistencia celular desaparece y es reversible (Desoize B y Jardillier J 2000). Por lo que los cultivos de esferoides tumorales multicelulares (MTS) son un modelo funcional *in vitro* de los tumores sólidos, dada su estructura general los MTS mimetizan las etapas iniciales de los micro tumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización. Los esferoides presentan una estructura característica de un tumor sólido, distinguiéndose en ellos tres capas celulares, una capa externa formada principalmente por células proliferativas, una zona intermedia formado por células quiescentes y un centro apoptótico y/o necrótico (Gallardo PJ et al., 2006 y Trédan O et al., 2007). Estas capas celulares, se verán influenciadas por el tamaño del esferoide dado que las células centrales estarán más alejadas de los nutrimentos entre ellos la glucosa y oxígeno, produciéndose así la muerte celular y necrosis. De acuerdo con esto, células apoptóticas en el centro del esferoide se han observado cuando alcanzan un tamaño de 500 μm aproximadamente, mientras que la apoptosis no es detectada en esferoides menor de 400 μm (Dufau I et al., 2012).

Para tener un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares que son regulados durante las etapas iniciales de formación de los esferoides, se utilizaron MTS de la línea celular MCF-7 con diámetro medio geométrico de aproximadamente 200 μm , en los que aún no se observó la expresión de la proteína HIF1 α , lo que indica una ausencia de hipoxia. Además, la identificación de células en arresto celular G0/ G1 por medio de la proteína p27Kip1 fueron observadas en todo el esferoide, pero

con una mayor concentración en la parte intermedia y finalmente una capa externa mejor delimitada de células proliferativas fue observada en la periferia del esferoide cuando se evaluó la proteína Ki67 la cual está presente en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero ausente en células en quiescencia (G0) (Scholzen T y Gerdes J 2000). Los cultivos de esferoides desarrollan un gradiente de oxígeno, nutrientes y catabolitos cuando alcanzan en promedio un diámetros entre 200 y 500 μ M, con una área necrótica central bien establecida en esferoides de 500 μ m (Dufau I et al., 2012). Las células situadas en la periferia del esferoide reflejan la situación *in vivo* de células tumorales que están en constante división y que están adyacentes a los capilares, mientras que las células más internas se quedan quiescentes y algunas de ellas saldrán de esta etapa para seguir ciclando y otras morirán por apoptosis o necrosis (Hirschhaeuser F et al., 2010). El establecimiento de gradientes fisiopatológicos y la organización concéntrica de células proliferantes, quiescentes y muertas dependerán principalmente del tamaño del esferoide y de la línea celular, pero en principio el comportamiento de los MTS es similar a la situación de nódulos tumorales avasculares, micrometastasis o microrregiones intercapilares de tumores sólidos *in vivo* (Hirschhaeuser F et al., 2010).

La metástasis es la principal causa de mortalidad por cáncer, un paso inicial en la metástasis del tumor es la migración celular. Dado que primero las células cancerosas se desprenden del tumor primario, presentan estrategias de migración seguida de la invasión, viajan a diferentes sitios a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, para finalmente establecerse en el sitio del órgano diana para formar un tumor secundario (Guan X 2015 y Yamaguchi H et al., 2005).

Por lo que se comparó la capacidad de migración de células crecidas como esferoides y células cultivadas en monocapa, encontrando una gran capacidad de migración por parte de las células derivadas de esferoides de 6 días de cultivo comparada con la nula capacidad de las células cultivadas como monocapas (Figura 7D).

Se ha reportado la importancia de HIF-1 α para promover la invasión y metástasis en cáncer, mediante la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT). El posible mecanismo molecular es que HIF-1 afecta indirectamente los niveles de algunas proteínas tales como vimentina y algunos receptores de membrana tales como de E-cadherina y N-cadherina (Wang H et al., 2016). Sin embargo, este fenotipo de migración en células derivadas de esferoides podría estar dado principalmente por las interacciones célula-célula y no por una influencia de hipoxia en el microambiente, dado que en este estadio del esferoide no se detectó la presencia de HIF-1 α , ni se observaron centros libres de células como un indicador de apoptosis o necrosis. Por lo que nos hemos centrado en la regulación de proteínas de membrana tales como claudina 1, plexina 2, ITGA2, ITGB6, ITGB5 y E-cadherina (CDH1), así como la proteína EPCAM.

Durante el desarrollo del tumor, las células cancerosas adquieren la capacidad de sostener una proliferación constante, evadir la supresión del crecimiento y formar metástasis. Además, una característica distintiva en los carcinomas es la pérdida del fenotipo epitelial y la ganancia de las características mesenquimales, un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT). Durante este proceso, que también es llevado a cabo durante el desarrollo embrionario, las uniones adherentes epiteliales se pierden y como consecuencia de ello se observa la desintegración de la capa epitelial junto con la pérdida de la polaridad-basal apical, entonces las células adquieren un fenotipo mesenquimal invasivo. El proceso EMT se ha relacionado con la pérdida de expresión de la proteína E-cadherina, en varios tumores de origen epitelial incluyendo cáncer de mama (Breier G et al., 2014). Por otro lado, tenemos la importancia de las claudinas, que son otro tipo de proteínas transmembranales de uniones estrechas. Las claudinas son mejor conocidas por sus interacciones homo y heterotípicas entre células epiteliales adyacentes, controlando las propiedades de permeabilidad celular en tejido específico de los epitelios. La elevada expresión de claudina 3, 4 y 7 se ha observado en cáncer de mama, ovario y de endometrio. Además, los altos niveles de expresión de

Claudina 4 se han identificado en la mayoría de los tumores de mama. Aunque la alta expresión de claudinas está bien documentada en células de cáncer derivadas del epitelio, el rol de estas proteínas en la motilidad celular y por favorecer al tumor ha recibido poca atención (Webb PG et al., 2013)

Algunos estudios, han reportado altos niveles de expresión de Claudina 4 y 3 en cáncer de mama triple-negativo, particularmente en carcinoma invasivo, dicha expresión se correlacionó con la expresión de la proteína Ki67 (Blanchard AA et al., 2009). Similar a lo anterior, Jiwa LS et al., (2014) correlacionaron los altos niveles de expresión de Claudina-4 con procesos de metástasis en cáncer de mama.

A su vez, las integrinas son receptores de la superficie celular que regulan las interacciones célula-célula/matriz extracelular y se han asociado con metástasis y/o transformación de varios tipos de cáncer. La expresión de $\beta 6$ integrina ha sido correlacionada con un comportamiento invasivo y de migración en varias líneas celulares de cáncer de mama (Li W et al., 2015).

Los sindecanos son miembros de la familia de proteoglicanos que regulan la unión celular, la señalización y organización del citoesqueleto. Por ejemplo, el Sindecano-1 juega un papel importante en la regulación de las funciones fisiológicas celulares de cáncer como son la proliferación, la diferenciación, la adhesión, migración y metástasis. En cáncer de mama una alta expresión de sindecano-1 se relacionó con un fenotipo agresivo y con un pronóstico desfavorable para el paciente (Lendorf ME et al., 2011). Finalmente, la glicoproteína transmembrana de adhesión EPCAM también juega un papel importante en la carcinogénesis de varios tipos de cáncer entre ellos el de mama, donde una alta expresión de la proteína fue asociada con tumores de mayor tamaño, metástasis ganglionar y en consecuencia una prognosis desfavorable para el paciente (Spizzo G et al., 2004 y van der Gun BT et al., 2010). Todos estos cambios en las moléculas de adhesión celular y su relación con las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular podrían estar jugando un papel central en las

primeras etapas de los tumores avasculares y micro-metástasis, ejemplificado en nuestro modelo de MTS.

Existe un gran interés en profundizar en los mecanismos moleculares que podrían estar regulando este fenotipo avascular tumoral en las etapas tempranas del esferoide, para ello se realizó un análisis de secuenciación masiva del RNA donde se encontraron 1122 mRNAs diferencialmente expresados. De acuerdo al programa IPA se identificaron los 20 mRNAs diferencialmente expresados con mayor alteración en cuanto a las veces de cambio (Fold-change) encontrando que todos ellos fueron asociados con cáncer de mama y 11 de éstos se relacionaron a su vez con metástasis (Tabla 2). Estos resultados dan soporte a la relevancia de estudios en esferoides de etapas tempranas en particular de la línea celular MCF-7.

Otro factor importante en el desarrollo de cáncer es la mitocondria un organelo subcelular, cuya función principal es la producción de ATP (Adenosín trifosfato) a través del proceso llamado fosforilación oxidativa (FOS) en donde principalmente los cinco complejos enzimáticos (I - V), la coenzima Q10 y la proteína transportadora de electrones llamada citocromo c son los responsables de llevar a cabo dicho proceso. Además, la mitocondria juega un papel importante en la muerte celular, regula varias de las señalizaciones celulares, inclusive la inmunidad innata y la autofagia a través de los principales mediadores de señalización tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dada la importancia de la mitocondria un ligero desequilibrio en su funcionamiento podría contribuir con una serie de enfermedades, incluyendo el desarrollo de cáncer y metástasis (He X et al., 2013). Se ha observado que las células cancerosas producen energía principalmente a través de una alta tasa de glucólisis, seguido por la producción de ácido láctico citosólico, en vez de producir energía por la vía de la oxidación aeróbica del piruvato en las mitocondrias, como es lo habitual en la mayoría de las células normales, a este fenómeno se le conoce como efecto Warburg (Xu XD et al., 2015). En nuestro modelo dos de las principales vías de señalización identificadas fueron la de fosforilación oxidativa y

disfunción mitocondrial de acuerdo al programa IPA, en donde se incluyen 55 genes mitocondriales diferencialmente expresados y 42 de ellos están involucrados en la fosforilación oxidativa. Nosotros corroboramos estos resultados midiendo la respiración mitocondrial, encontrando que los esferoides presentaron un aumento considerable en la respiración celular en comparación con las células en monocapa. Lo que sugiere que la vía metabólica de energía predominante en MTS está dada por la fosforilación oxidativa, aunque no se descarta la idea de que la glucólisis también podría contribuir de manera considerable con la energía dado que fueron identificados varios genes involucrados en esta vía como son: ENO1, FBP1, G6PD, GAPDH, ODC1, PDHB, PGD, PGK1, SDHB, TALDO1, TKT, TPI1, PFKL, ALDOA, PGK1 así como AKT1 un regulador del metabolismo de glucosa (Rathmell JC et al., 2003). Como lo reporta Rodríguez-Enríquez S et al., (2008) en MTS de etapas iniciales de formación (<500 μm de diámetro) de células HeLa y Hek293 donde las principales fuentes de ATP fueron proporcionadas por ambas vías (fosforilación oxidativa y glucólisis). Además, los MTS de etapas iniciales mostraron una tasa mayor de fosforilación oxidativa en comparación con esferoides de etapas tardías (alrededor de 1 mm de diámetro) (Rodríguez-Enríquez S et al., 2008). Otros estudios relacionados con los flujos metabólicos de la fosforilación oxidativa y glucólisis fueron realizados en las fracciones de células quiescentes y proliferativas de esferoides de células MCF-7 (con tamaños > 800 μm de diámetro), en donde hubo un incremento considerable de la vía de la glucólisis, sin embargo la fosforilación oxidativa fue la principal proveedora de ATP en ambas fracciones celulares (Mandujano-Tinoco EA et al., 2013). Hay que destacar que el primer estudio no fue realizado en esferoides de MCF-7 y en el segundo estudio los procesos metabólicos solo se evaluaron en fracciones celulares y no en el esferoide completo, por lo que la vía de glucólisis en esferoides de MCF-7 de estadios tempranos requiere una mayor investigación.

La producción de energía es fuertemente asociada con los procesos de apoptosis, metástasis y resistencia celular en células tumorales. Los complejos responsables del sistema de fosforilación

oxidativa se vuelven un blanco, para la utilización de drogas específicas dirigidas hacia ellos, para un efecto antineoplásico. Por ejemplo, la metformina se comporta como un fármaco débil mitocondrial debido a su actividad inhibidora de Complejo I y que además ha sido evaluada como un agente anti-cáncer en ensayos preclínicos de modelos animales. Del mismo modo malonato y oxaloacetato (OAA) son inhibidores competitivos del complejo II (succinato deshidrogenasa) (Wojtovich AP y Brookes PS 2008) y azida un inhibidor de Complejo IV (Chen Q et al., 2003) por lo que se podrían desarrollar para ensayos clínicos. Debido al tamaño de los MTS y la ausencia de hipoxia, la hipótesis planteada es que estos cambios se basan principalmente en las interacciones célula-célula y célula-microambiente. Este último cambio sería el resultado de la presencia diversos procesos bioquímicos que se están generando. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la contribución relativa de cada fenómeno.

Otras de las vías principales que fueron alteradas en MTS son la de señalización de eIF2 (Figura 8D, 9C y Tabla 3), regulación de eIF4 y p70S6K (Figura 8D, 9D y Tabla 3) y señalización de mTOR (Figura 8D, 9E y Tabla 3). El control de la traducción juega un papel crucial en la regulación de expresión de genes que regulan así los procesos celulares incluyendo proliferación, apoptosis y diferenciación, etc. Las fases iniciales en la síntesis de proteínas requieren un conjunto de eIFs (factores de iniciación de la traducción eucariótica) que se componen de múltiples subunidades polipeptídicas. Entre ellas el factor eIF2 (factor-2 de iniciación de la traducción eucariótica) que es una proteína de unión a GTP (guanosina trifosfato) y juntas regulan la unión del Met-tRNA (Metionina-RNA de transferencia) a los ribosomas, además EIF2 se encarga de identificar los sitios de inicio de la traducción (IPA ingenuity pathways analysis). El factor eIF4E como parte del complejo eIF4F interactúa primero con el mRNA y facilita el reclutamiento a la subunidad ribosomal 40S. La actividad de estos factores esta regulada a varios niveles, sin embargo dentro de las principales vías de regulación se encuentra: la de PI3K (Fosfoinositol-3 cinasa)/Akt (proteína cinasa B)/mTOR (La diana

de rapamicina en células de mamífero). La hiperactivación de estas vías ocurre en la mayoría de los cánceres y como resultado un incremento en la actividad de dichos factores promoviendo así la tumorigénesis (Siddiqui N y Sonenberg N 2015 y Rajesh K et al., 2015). Los altos niveles de expresión de eIF4E potencian a su vez los niveles de traducción de ciertos mRNAs incluyendo el gen ciclina D1, llevando así a una transformación o desorden celular (Flynn A y Proud CG 1996). Por su parte la proteína 4EBP1 (proteína de unión a 4E) puede reprimir la actividad del complejo EIF4 dado que se encuentra unido a él, pero una vez que el inhibidor es fosforilado el factor de transcripción es liberado promoviendo así la traducción de proteínas. Al parecer 4EBP1 está bajo el control de la vía de p70S6K, que juega un papel en la progresión del ciclo celular (Flynn A y Proud CG 1996).

La proteína p70S6K o S6K1 es una cinasa Serina / Treonina que regula la fosforilación de las proteínas S6 de la unidad ribosomal 40S y está relacionada con diversos procesos celulares como es la síntesis de proteínas, procesamiento del mRNA, homeostasis de glucosa, crecimiento celular, proliferación, invasión, migración y apoptosis (Tu ZJ et al., 2015 y Dufner A y Thomas G. 1999). Se ha reportado que S6K1 dirige específicamente la progresión del ciclo celular en la fase G1/S y cuando esta proteína se encuentra en altos niveles de expresión favorece el aumento de la proliferación celular una característica de la transformación neoplásica (Holz MK et al., 2012). Por ejemplo, señales de S6K1 pueden ser particularmente importantes para la proliferación de células de cáncer de mama positivas para ER (receptor de estrógenos), uno de los mecanismos moleculares por los cuales S6K1 controla la proliferación es por una directa fosforilación del receptor ER α (receptor de estrógenos alfa) en la serina 167 y como consecuencia de ello un incremento en la actividad transcripcional de este receptor (Holz MK et al., 2012).

El factor eIF4, 4EBP y p70S6K son proteínas río debajo de la vía de señalización de mTOR (Hu A et al., 2014 y Holz MK et al., 2012). En las células eucariotas existen dos complejos mTORC1 y mTORC2 en donde mTORC1 fosforila a los efectores cinasas S6K1 y 4EBP1 (IPA ingenuity

pathways analysis), por su parte mTORC2 controla algunas proteínas del citoesqueleto como son filamina A, también regula a la proteína AKT (Sato T et al., 2016, Hu A et al., 2014 y Holz MK et al., 2012). A su vez, la proteína mTOR es un vital componente río abajo de la vía de señalización PI3K/AKT. La activación de PI3K es a través de factores de crecimiento río arriba o ligandos a fines a sus receptores de membrana tirosina (RTKs) que incluye la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal humano (HER), receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1), entre otros. La proteína PI3K a través de otras moléculas intermediarias fosforilan AKT (cinasa serina/treonina) estimulando así la síntesis de proteínas y crecimiento celular a través de la activación de la vía de mTOR (Lee JJ et al., 2015)

En paralelo de acuerdo al programa IPA se identificaron algunas vías asociadas con ciclo celular entre ellas se encontró la vía de PI3K/AKT, la vía de señalización donde estrógeno regula la fase de síntesis (S) y checkpoint G1/S del ciclo celular.

Los estrógenos son hormonas sexuales y sus efectos están regulados por los receptores de estrógeno (RE) que actúan como factores de transcripción dependientes de ligandos. Los estrógenos inducen la proliferación de células ER-positivas regulando la fase de transición G1/S del ciclo celular, en donde un aumento en la expresión de proteínas tales como ciclinas, la activación de CDK (cinasas dependientes de ciclinas) y fosforilación de la proteína supresora de tumor Rb (retinoblastoma) están involucradas. La proteínas CDKs controlan el ciclo celular por lo que una ligera alteración en estas proteínas se han asociado con procesos oncogénicos, uno de los principales blancos de estas CDKs es la proteína Rb en la fase G1 y el mecanismo por el cual regulan el ciclo celular está dado por los estados de fosforilación de la proteína Rb dado que cuando se desfosforilan los complejos Rb son capaces de unirse y bloquear la activación de los factores transcripcionales E2F, pero una vez que el complejo Ciclinas-CDK (CDK4/6-ciclin D y CDK2-ciclin E) fosforila a la proteína Rb esta se disocia de los factores E2F por lo que quedan libres para activar la transcripción de genes involucrados en la

progresión de la fase G1 a S (IPA ingenuity pathways analysis). Los estrógenos también regulan la expresión del gen c-Myc donde este último converge con la activación del complejo ciclina E-cdk2 regulando así la progresión del ciclo celular (IPA Ingenuity analysis).

Recientemente estudios genómicos han revelado el papel que juegan los lncRNAs en una variedad de enfermedades, incluyendo la tumorigénesis. Los lncRNAs pueden regular la expresión de genes a nivel transcriptional, post-transcriptional, traducción, etc., (Luo G et al., 2015, Ponting CP et al., 2009 y Mercer TR et al., 2009). En cáncer de mama varios lncRNAs son identificados como oncogenes y algunos otros como supresores de tumores (Prensner JR y Chinnaiyan AM 2011). Los lncRNAs tienen una participación en el crecimiento celular, apoptosis, migración, invasividad así como también se han identificado en células troncales en el tumor (Liu Y et al., 2015). Por lo que en este estudio se investigó la presencia de lncRNAs en MTS encontrando un número muy similar de genes lncRNAs y mRNAs diferencialmente expresados (1502 y 1122 respectivamente). Varios de los lncRNAs se expresaron de *novó*, es decir que solo fueron detectados en una condición de cultivo pero no en ambas (Monocapa o MTS). Investigaciones anteriores han demostrado que los lncRNAs son capaces de regular a genes que se ubican hasta a 10Kb de distancia (Ponting CP et al., 2009). Por esta razón se buscó la relación posicional entre lncRNA y mRNA en base principalmente al nombre del gen, dado que de acuerdo a la base de datos de LNCipedia el nombre del lncRNAs se asigna en base a nombre del mRNAs más cercano, encontrando 63 genes co-regulados de los cuales 35 fueron regulados de manera positiva es decir tanto el mRNA como el lncRNA estuvieron inducidos o viceversa reprimidos en MTS, uno ellos en particular el gen PMP22 que es un mRNA que se ha asociado con metástasis en cáncer de mama y que hasta la fecha no se ha relacionado con algún lncRNAs (Mimori K et al., 2005). Otros 20 lncRNAs tuvieron un cambio en dirección opuesta con respecto a su gen mRNA vecino. En algunos casos encontramos que un lncRNAs tenía de 2 a 3 genes mRNAs vecinos que también fueron diferencialmente expresados. Tal es el caso, del lnc-GAPDH y sus co-regulado genes vecinos NOP2

que presenta altos niveles de expresión tanto de la proteína como del mRNA en carcinomas de mama y esto es debido a una alterada tasa en la transcripción del gen (Fonagy A et al., 1995), el gen MRPL51 que hasta el momento no se ha relacionado con cáncer de mama y GAPDH. La enzima GAPDH se encuentra principalmente en el citoplasma bajo condiciones basales y además de su participación en la glucólisis, la proteína GAPDH también está implicada en varios de los procesos celulares como son la reparación del DNA, la exportación del tRNA, la fusión de membrana y transporte, la dinámica del citoesqueleto y la muerte celular (Tristan C et al., 2011 y Sirover MA 2012). Además del citoplasma, GAPDH también se encuentra en el núcleo, mitocondria y fracciones vesiculares pequeñas. Sin embargo, los niveles GAPDH en la mitocondria aumentan en condiciones de estrés como son la privación de suero y daños al DNA (Tristan C et al., 2011).

Se ha demostrado que el flavonoide Rotenona es usado para producir parkinosismo de forma experimental al inhibir el complejo I de la mitocondria, como consecuencia se bloquea la respiración que resulta en la apoptosis celular y además induce el mal plegamiento y agregación de la proteína GAPDH (Liang S et al., 2015). Dado la importancia del gen GAPDH y de su participación en una de las principales vías canónicas la de disfunción mitocondrial, es de gran interés conocer si el lncRNA-GAPDH juega un papel en el gen vecino GAPDH, así como en los genes lncRNAs vecinos de NOP2 y MRPL51.

Otras de las vías de interés fue la de fosforilación oxidativa, donde se encontraron varios lncRNAs y genes mRNA vecinos involucrados con la mitocondria incluidas la Gamma-glutamyl ciclotransferasa (GGCT) (Kageyama S et al., 2015), el gen síndrome de Shwachman- Diamond (SBDS) (Henson, AL., et al., 2013), proteína Parkinson 7 (PARK7) (Toyoda Y et al., 2014), Receptor de progesterona (PGR) (Feng Q et al., 2014), Citocromo b5 tipo A (CYB5A) (Neve EP et al., 2012), Proteína ribosomal S14 (RPS14) (Jia Z et al., 2015), factor de ADP-ribosilación/ ARF proteína 4

(ARF4/ARL4) (Li CC et al., 2012) y transportador de soluto familia 12 (sodio/potasio/cloro) miembro 2 (SLC12A2) (Kintner DB et al., 2007).

Finalmente, vale la pena mencionar que se identificaron en los cromosomas 1, 6 y 12 tres grupos mRNAs de histonas co-regulados con varios lncRNAs. Sin embargo hasta este momento no hay información de estos lncRNAs en cuanto a su función, participación en alguna patología, relación con otros genes, etc. La regulación epigenética ha contribuido en la tumorigénesis y metástasis, en donde múltiples histonas metiltransferasas y desmetilasas han sido involucradas por su papel que juegan en la regulación como supresores de tumores o bien como oncogenes (Zhao QY et al., 2016). Por ejemplo, EZH2 es la subunidad catalítica del complejo represivo polycomb 2 (PRC2) que reprime la transcripción a través de la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3) y se demostró su función como oncogen en cáncer de prostata (Xu K et al., 2012). Algunos lncRNAs se han identificado por el papel que juegan en los procesos epigenéticos tal es el caso del lncRNA HOTAIR que se une al complejo PRC2 en el extremo 5' mientras que en el extremo 3' se une al complejo represor LSD1/CoREST/REST. El complejo PRC2 tiene actividad de metiltransferasa de histonas y el complejo supresor LSD1/CoREST/REST en donde la proteína LSD1 tiene actividad de desmetilación (Wang KC y Chang HY 2011, Wapinski O y Chang HY 2011 y Tsai MC et al., 2010). Por lo que HOTAIR no solo coordina la metilación de histonas H3K27 si no también la desmetilación para el silenciamiento de genes epigenético (Tsai MC et al., 2010). Por lo tanto se requiere una mayor exploración para conocer si algunos de estos co-regulados mRNAs/lncRNAs estas operando entre sí y con un interés en particular de los lncRNAs cercanos al grupo de histonas.

CONCLUSIONES

En este estudio se describió el transcriptoma de genes codificantes mRNAs y no codificantes lncRNAs que fueron diferencialmente expresados en MTS de cáncer de mama de estadios tempranos. Con respecto a los mRNAs se encontraron tres grupos principales de genes, el primero fue el de proteínas de membrana implicados en uniones célula-célula, tales como claudina 1, claudina 4, integrinas, plexina 2, sindecanos (1 y 4), así como EPCAM y E-cadherina. El segundo conjunto de genes fue asociado con metástasis de cáncer de mama entre estos se encuentran las proteínas Claudina 1 y 4, EPCAM, E-cadherina, PMP22, MIF entre otros. Dichos genes podrían estar involucrados en la habilidad de migración por parte de las células derivadas de esferoides. Y el tercer grupo de genes fueron los relacionados a los complejos mitocondriales, incluyendo en este grupo los genes involucrados con la hiperactivación de la fosforilación oxidativa en MTS, dicho proceso fue confirmado con ensayos funcionales. Finalmente, se identificaron varios lncRNAs co-regulados con mRNAs vecinos, donde estos mRNAs fueron involucrados sobre todo en un modo binario y además estuvieron involucrados con algunos procesos celulares como es la metástasis en cáncer de mama, glucólisis, disfunción mitocondrial y ciclo celular. En particular, se identificó un grupo interesante de lncRNAs co-regulados con genes mRNAs vecinos de histonas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de este estudio, se presentan los resultados obtenidos como una primera etapa en la exploración de los mRNAs y lncRNAs diferencialmente expresados en MTS de cáncer de mama de estadios tempranos en donde las perspectivas futuras se orientan principalmente en:

1. Determinar la participación de los genes implicados en las uniones célula-célula, célula- matriz extracelular en la habilidad de migración de las células derivadas de esferoides. Así como la relevancia que tienen los genes mRNAs asociados con metástasis en los estadios tempranos de formación en MTS.
2. Se requiere explorar el proceso de glucólisis y su contribución con el metabolismo energético en MTS de estadios tempranos.
3. Evaluar si existe una relación entre los lncRNAs y sus mRNAs vecinos, principalmente de aquellos mRNAs involucrados con algunos procesos celulares como es la metástasis en cáncer de mama, glucólisis, disfunción mitocondrial y ciclo celular. Con un gran interés es los lncRNAs co-regulados con genes mRNAs vecinos de histonas.

LITERATURA CITADA

- Abd-Elazeem MA y Abd-Elazeem MA. (2015). Claudin 4 expression in triple-negative breast cancer: correlation with androgen receptors and Ki-67 expression. *Ann Diagn Pathol*, 19(1), 37-42.
- Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, Bagnardi V, Viale G, Curigliano G, et al., (2014). A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer*, 50(2), 277-289.
- American Cancer Society (2016): <http://www.cancer.org/>
- Barciszewski J y Volker AE. (2003). Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine. Ed. Landes Bioscience. Chapter1 y 2. Pag 292 en línea
- Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, de Herreros AG et al., (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev*, 22(6), 756-769.
- Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, et al., (2009). Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch*, 454(6), 647-656.
- Boo L, Ho WY, Ali NM, Yeap SK, Ky H, Chan KG, Cheong SK et al., (2016). MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line. *Int J Biol Sci*, 12(4), 427-445.
- Breier G, Grosser M y Rezaei M. (2014). Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res*, 355(3), 523-527.
- Costa FF. (2009). Non-coding RNAs and new opportunities for the private sector. *Drug Discov Today*, 14(9-10), 446-452.
- Costa FF. (2010). Non-coding RNAs: Meet thy masters. *Bioessays*, 32(7), 599-608.
- Cremaschi P, Carriero R, Astrologo S, Coli C, Lisa A, Parolo S, et al., (2015). An Association Rule Mining Approach to Discover lncRNAs Expression Patterns in Cancer Datasets. *Biomed Res Int*, 2015, 146250.
- Chen et al., LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res*. (2013) Available at: <http://www.cuilab.cn/lncrnadisease>. (Accessed: 19 th January 2016)
- Chen D, Zhang R, Shen W, Fu H, Liu S, Sun K, et al., (2013). RPS12-specific shRNA inhibits the proliferation, migration of BGC823 gastric cancer cells with S100A4 as a downstream effector. *Int J Oncol*, 42(5), 1763-1769.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL y Lesnefsky EJ (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, 278(38), 36027-36031
- Chittenden TW, Pak J, Rubio R, Cheng H, Holton K, Prendergast N, Quackenbush J et al., (2010). Therapeutic implications of GIPC1 silencing in cancer. *PLoS One*, 5(12), e15581
- Dago DN, Scafoglio C, Rinaldi A, Memoli D, Giurato G, Nassa G, et al., (2015). Estrogen receptor beta impacts hormone-induced alternative mRNA splicing in breast cancer cells. *BMC Genomics*, 16, 367.
- Dalgin GS, Alexe G, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, Ganesan S, et al., (2007). Portraits of breast cancer progression. *BMC Bioinformatics*, 8, 291.
- Deng SS, Xing TY, Zhou HY, Xiong RH, Lu YG, Wen B, et al., (2006). Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 4(3), 165-172.

- Desoize B y Jardillier J. (2000). Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol*, 36(2-3), 193-207.
- Diederichs S. (2010). [Non-coding RNA in malignant tumors. A new world of tumor biomarkers and target structures in cancer cells]. *Pathologie*, 31 Suppl 2, 258-262.
- Doyle LA, Yang W, Rishi AK, Gao Y y Ross DD. (1996). H19 gene overexpression in atypical multidrug-resistant cells associated with expression of a 95-kilodalton membrane glycoprotein. *Cancer Res*, 56(13), 2904-2907.
- Dufau I, Frongia C, Sicard F, Dedieu L, Cordelier P, Ausseil F, et al., (2012). Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 12, 15.
- Dufner A y Thomas G (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res*, 253(1), 100-109.
- Esteller M (2011). Epigenetic changes in cancer. *Biol Rep*, 3:9.
- Feng Q, Crochet JR, Dai Q, Leppert PC y Price TM. (2014). Expression of a mitochondrial progesterone receptor (PR-M) in leiomyomata and association with increased mitochondrial membrane potential. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(3), E390-399.
- Figueiredo NB, Cestari SH, Conde SJ, Luvizotto RA, De Sibio MT, Perone D, et al., (2014). Estrogen-responsive genes overlap with triiodothyronine-responsive genes in a breast carcinoma cell line. *ScientificWorldJournal*, 2014, 969404.
- Flynn A y Proud CG (1996). The role of eIF4 in cell proliferation. *Cancer Surv*, 27, 293-310.
- Fonagy A, Swiderski C y Freeman JW (1995) Altered transcription control is responsible for the increased level of proliferation-associated P120 in rapidly growing breast carcinoma. *Int J Cancer*, 60(3), 407-12.
- Francia G, Man S, Teicher B, Grasso L y Kerbel RS. (2004). Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents. *Mol Cell Biol*, 24(15), 6837-6849.
- Gallardo PJ, Espinosa CM, Meléndez ZJ y Maldonado LV. (2006). Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *REB*. 25(4): 101-107
- Guan X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B*, 5(5), 402-418.
- Gumireddy K, Li A, Kossenkov AV, Cai KQ, Liu Q, Yan J, et al., (2014). ID1 promotes breast cancer metastasis by S100A9 regulation. *Mol Cancer Res*, 12(9), 1334-1343.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, . . . Chang HY (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071-1076.
- Habashy HO, Powe DG, Glaab E, Ball G, Spiteri I, Krasnogor N, et al., (2011). RERG (Ras-like, oestrogen-regulated, growth-inhibitor) expression in breast cancer: a marker of ER-positive luminal-like subtype. *Breast Cancer Res Treat*, 128(2), 315-326.
- He X, Zhou A, Lu H, Chen Y, Huang G, Yue X, et al. (2013). Suppression of mitochondrial complex I influences cell metastatic properties. *PLoS One*, 8(4), e61677.
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W y Kunz-Schughart LA. (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, 148(1), 3-15.
- Holz MK (2012). The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. *Cell Cycle*, 11(17), 3159-3165.
- Hu A, Sun M, Yan D y Chen K. (2014) Clinical significance of mTOR and eIF4E expression in invasive ductal carcinoma. *Tumori*, 100(5), 541-6.

- Huber-Keener KJ, Liu X, Wang Z, Wang Y, Freeman W, Wu S, et al., (2012). Differential gene expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells revealed by a new analytical model of RNA-Seq data. *PLoS One*, 7(7), e41333.
- Jia Z, Ai X, Sun F, Zang T, Guan Y y Gao F. (2015). Identification of new hub genes associated with bladder carcinoma via bioinformatics analysis. *Tumori*, 101(1), 117-122.
- Jiwa LS, van Diest PJ, Hoefnagel LD, Wesseling J, Wesseling P, Dutch Distant Breast Cancer Metastases C, et al., (2014). Upregulation of Claudin-4, CAIX and GLUT-1 in distant breast cancer metastases. *BMC Cancer*, 14, 864.
- jones VS, Huang RY, Chen LP, Chen ZS, Fu L y Huang RP. (2016). Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta*, 1865(2), 255-265.
- Kageyama S, Hanada E, Ii H, Tomita K, Yoshiki T y Kawauchi A. (2015). Gamma-Glutamylcyclotransferase: A Novel Target Molecule for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biomed Res Int*, 2015, 345219.
- Karagiannis GS, Berk A, Dimitromanolakis A y Diamandis EP. (2013). Enrichment map profiling of the cancer invasion front suggests regulation of colorectal cancer progression by the bone morphogenetic protein antagonist, gremlin-1. *Mol Oncol*, 7(4), 826-839.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M y Nielsen LK. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*, 83(2), 173-180.
- Kintner DB, Luo J, Gerdts J, Ballard AJ, Shull GE y Sun D. (2007). Role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport and Na⁺/Ca²⁺ exchange in mitochondrial dysfunction in astrocytes following in vitro ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(3), C1113-1122.
- Kuo MT. (2007). Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol*, 608, 23-30.
- Kurokawa R. (2011). Promoter-associated long noncoding RNAs repress transcription through a RNA binding protein TLS. *Adv Exp Med Biol*, 722,196-208.
- Kyle AH, Huxham LA, Yeoman DM y Minchinton AI. (2007). Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 13(9), 2804-2810.
- Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al., (2009). Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer*, 124(9), 2088-2097.
- Lee JJ, Loh K y Yap YS. (2015). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med*. 12(4),342-54.
- Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HA y Couchman JR. (2011). Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*, 59(6), 615-629.
- Li CC, Wu TS, Huang CF, Jang LT, Liu YT, You ST, et al., (2012). GTP-binding-defective ARL4D alters mitochondrial morphology and membrane potential. *PLoS One*, 7(8), e43552.
- Li G, Zhao F y Cui Y. (2013). Proteomics using mammospheres as a model system to identify proteins deregulated in breast cancer stem cells. *Curr Mol Med*, 13(3), 459-63.
- Ling V (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40 Suppl, S3-8.
- Li W, Liu Z, Zhao C y Zhai L. (2015). Binding of MMP-9-degraded fibronectin to beta6 integrin promotes invasion via the FAK-Src-related Erk1/2 and PI3K/Akt/Smad-1/5/8 pathways in breast cancer. *Oncol Rep*, 34(3), 1345-1352.

- Li X, Wen W, Liu K, Zhu F, Malakhova M, Peng C, et al., (2011). Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines. *J Biol Chem*, 286(25), 22291-22299.
- Liang S, Figtree G, Aiqun M y Ping Z. (2015). GAPDH-knockdown reduce rotenone-induced H9C2 cells death via autophagy and anti-oxidative stress pathway. *Toxicol Lett*, 234(3), 162-171.
- Liu J, Gough J y Rost B. (2006). Distinguishing protein-coding from non-coding RNAs through support vector machines. *PLoS Genet*, 2(4), e29.
- Liu L, Xu Q, Cheng L, Ma C, Xiao L, Xu D, et al. (2015). NPY1R is a novel peripheral blood marker predictive of metastasis and prognosis in breast cancer patients. *Oncol Lett*, 9(2), 891-896.
- Liu Y, Sharma S y Watabe K. (2015). Roles of lncRNA in breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*, 7, 94-108.
- Luo G, Wang M, Wu X, Tao D, Xiao X, Wang L, Jiang G et al., (2015). Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 37(6), 2209-2220.
- Ma J, Dong C y Ji C. (2010). MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther*, 17(8), 523-531.
- Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Perez JC, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R y Rodriguez-Enriquez S (2013). Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta*, 1833(3), 541-551.
- McKiernan E, McDermott EW, Evoy D, Crown J y Duffy MJ. (2011). The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol*, 32(3), 441-450.
- Mercer TR, Dinger ME y Mattick JS. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 10(3), 155-159.
- Miller WR y Larionov AA (2012). Understanding the mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res*, 14(1), 201.
- Mimori K, Kataoka A, Yoshinaga K, Ohta M, Sagara Y, Yoshikawa Y, et al., (2005). Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 22(1), 59-67.
- Mock K, Preca BT, Brummer T, Brabletz S, Stemmler MP y Brabletz T. (2015). The EMT-activator ZEB1 induces bone metastasis associated genes including BMP-inhibitors. *Oncotarget*, 6(16), 14399-14412.
- Morrison BJ, Hastie ML, Grewal YS, Bruce ZC, Schmidt C, Reynolds BA, Lopez JA et al., (2012). Proteomic comparison of mcf-7 tumoursphere and monolayer cultures. *PLoS One*, 7(12), e52692.
- Motaghed M, Al-Hassan FM y Hamid SS. (2014). Thymoquinone regulates gene expression levels in the estrogen metabolic and interferon pathways in MCF7 breast cancer cells. *Int J Mol Med*, 33(1), 8-16.
- Nakano S, Iyama K, Ogawa M, Yoshioka H, Sado Y, Oohashi T, et al., (1999). Differential tissular expression and localization of type IV collagen alpha1(IV), alpha2(IV), alpha5(IV), and alpha6(IV) chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors. *Lab Invest*, 79(3), 281-292.
- National Cancer Institute (2006). PDQ System of the Act Cancer treatment information, Breast Cancer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/>
- Neve EP, Nordling A, Andersson TB, Hellman U, Diczfalusy U, Johansson I, et al., (2012). Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J Biol Chem*, 287(9), 6307-6317.


- Ohta N, Ishiguro S, Kawabata A, Uppalapati D, Pyle M, Troyer D, et al., (2015). Human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells suppress the growth of breast cancer by expression of tumor suppressor genes. *PLoS One*, 10(5), e0123756.
- Ponting CP, Oliver PL y Reik W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629-641.
- Prensner JR y Chinnaiyan AM (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*, 1(5), 391-407.
- Rajesh K, Krishnamoorthy J, Kazimierczak U, Tenkerian C, Papadakis AI, Koromilas AE et al., (2015) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. *Cell Death Dis*, 15(6), e1591.
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol*. 23(20),7315-28.
- Redis RS, Berindan-Neagoe I, Pop VI y Calin GA. (2012). Non-coding RNAs as theranostics in human cancers. *J Cell Biochem*, 113(5), 1451-1459.
- Reich NC. (2013). A death-promoting role for ISG54/IFIT2. *J Interferon Cytokine Res*, 33(4), 199-205.
- Ring A y Dowsett M (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer*, 11(4), 643-658.
- Rodriguez-Enriquez S, Gallardo-Perez JC, Aviles-Salas A, Marin-Hernandez A, Carreno-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, et al., (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol*, 216(1), 189-197.
- Rönnau CG, Verhaegh GW, Luna-Velez MV y Schalken JA. (2014). Noncoding RNAs as novel biomarkers in prostate cancer. *Biomed Res Int*. 2014:591703
- Ruddon RW. (2007). *Cancer Biology*: Oxford University Press, USA
- Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Nolsri E y Richardson DR. (2010). Iron chelator-mediated alterations in gene expression: identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53. *Mol Pharmacol*, 77(3), 443-458.
- Sato T, Ishii J, Ota Y, Sasaki E, Shibagaki Y y Hattori S (2016). Mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 regulates filamin A-dependent focal adhesion dynamics and cell migration. *Genes Cells*.
- Siddiqui N y Sonenberg N (2015). Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans*, 43(5), 763-772.
- Scurr LL, Guminski AD, Chiew YE, Balleine RL, Sharma R, Lei Y, et al., (2008). Ankyrin repeat domain 1, ANKRD1, a novel determinant of cisplatin sensitivity expressed in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 14(21), 6924-6932.
- Scholzen T y Gerdes J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322.
- Sengupta D, Bhargava DK, Dixit A, Sahoo BS, Biswas S, Biswas G, et al., (2014). ERbeta signalling through FST and BCAS2 inhibits cellular proliferation in breast cancer cells. *Br J Cancer*, 110(8), 2144-2158.
- Sirover MA. (2012). Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *J Cell Biochem*, 113(7), 2193-2200.
- Song X, Cao G, Jing L, Lin S, Wang X, Zhang J, et al., (2014). Analysing the relationship between lncRNA and protein-coding gene and the role of lncRNA as ceRNA in pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med*, 18(6), 991-1003.

- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Gastl G et al., (2004) High EpCAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer, *86(3)*, 207-13.
- Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS y Egorin MJ. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res*, *8(3)*, 878-884.
- Tong D, Heinze G, Pils D, Wolf A, Singer CF, Concin N, et al., (2010). Gene expression of PMP22 is an independent prognostic factor for disease-free and overall survival in breast cancer patients. *BMC Cancer*, *10*, 682.
- Toyoda Y, Erkut C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Muller DJ, et al., (2014). Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biol Open*, *3(8)*, 777-784.
- Tredan O, Galmarini CM, Patel K y Tannock IF. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, *99(19)*, 1441-1454.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distanti V, Pazzagli M, et al. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, *309(2)*, 293-300.
- Tristan C, Shahani N, Sedlak TW y Sawa A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*, *23(2)*, 317-323.
- Tsai MC, Spitale RC y Chang HY. (2011). Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression. *Cancer Res*, *71(1)*, 3-7.
- Tsang WP, Wong TW, Cheung AH, Co CN y Kwok TT. (2007). Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR. *RNA*, *13(6)*, 890-898.
- Tu ZJ, Hu GY y Li QB (2015). [Research progress of p70 ribosomal protein S6 kinase inhibitors]. *Yao Xue Xue Bao*, *50(3)*, 261-271
- van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM y Rots MG (2010). EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*, *31(11)*, 1913-1921.
- Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schutz AK, Lue H, Lennartz B, et al., (2009). Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*, *9*, 230.
- Wang H, Molina J, Jiang J, Ferber M, Pruthi S, Jatkoje T, et al., (2013). Gene expression markers in circulating tumor cells may predict bone metastasis and response to hormonal treatment in breast cancer. *Mol Clin Oncol*, *1(6)*, 1031-1038.
- Wang KC y Chang H Y (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, *43(6)*, 904-914.
- Wapinski O y Chang HY. (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*, *21(6)*, 354-361.
- Webb PG, Spillman MA y Baumgartner HK. (2013). Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC Cell Biol*, *14*, 19.
- Whitaker HC, Shiong LL, Kay JD, Gronberg H, Warren AY, Seipel A, et al., (2014). N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate peptidase-like 2 is overexpressed in cancer and promotes a pro-migratory and pro-metastatic phenotype. *Oncogene*, *33(45)*, 5274-5287.
- Winslow S, Leandersson K y Larsson C. (2013). Regulation of PMP22 mRNA by G3BP1 affects cell proliferation in breast cancer cells. *Mol Cancer*, *12(1)*, 156.

- Wojtovich AP y Brookes PS. (2008). The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8), 882-889.
- Wong NA, Wingate J y Colling R. (2014). A study of alpha5 chain of collagen IV, caldesmon, placental alkaline phosphatase and smoothelin as immunohistochemical markers of gastrointestinal smooth muscle neoplasms. *J Clin Pathol*, 67(2), 105-111.
- Xue X, Yang YA, Zhang A, Fong KW, Kim J, Song B, Yu J et al., (2015). LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogene*.
- Xu K, Wu ZJ, Grone AC, He HH, Cai C, Lis RT, Brown M et al., (2012). EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*, 338(6113), 1465-1469.
- Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, et al., (2015). Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol Res Treat*, 38(3), 117-122.
- Yamaguchi H, Wyckoff J y Condeelis J. (2005). Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5), 559-564.
- Yeung ML y Jeang KT. (2011). MicroRNAs and cancer therapeutics. *Pharm Res*, 28(12), 3043-3049.
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO y Ladman AJ. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*, 37(10), 3639-3643.
- Zhang J, Zhang P, Wang L, Piao HL y Ma L. (2014). Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46(1), 1-5.
- Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, et al., (2003). A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11), 5119-5126. doi:10.1210/jc.2003-030222
- Zhao G, Jiao F, Liao Q, Luo H, Li H, Sun L, et al., (2013). Genome-wide identification of cancer-related polyadenylated and non-polyadenylated RNAs in human breast and lung cell lines. *Sci China Life Sci*, 56(6), 503-512. doi:10.1007/s11427-013-4485-1
- Zhao QY, Lei PJ, Zhang X, Zheng JY, Wang HY, Zhao J, Wu M et al., (2016). Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. *Clin Epigenetics*, 31(8), 34.
- Zhou Y, Arai T, Horiguchi Y, Ino K, Matsue T y Shiku H. (2013). Multiparameter analyses of three-dimensionally cultured tumor spheroids based on respiratory activity and comprehensive gene expression profiles. *Anal Biochem*, 439(2), 187-193.

ANEXO

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids

Received: 10 August 2015

Accepted: 02 March 2016

Published: 29 March 2016

Rosario Pacheco-Marín^{1,5}, Jorge Melendez-Zajgla², Gonzalo Castillo-Rojas³, Edna Mandujano-Tinoco², Alfredo Garcia-Venzor², Salvador Uribe-Carvajal⁴, Alfredo Cabrera-Orefice⁴, Carolina Gonzalez-Torres², Javier Gaytan-Cervantes², Irma B. Mitre-Aguilar⁶ & Vilma Maldonado¹

Oxygen or nutrient deprivation of early stage tumoral spheroids can be used to reliably mimic the initial growth of primary and metastatic cancer cells. However, cancer cell growth during the initial stages has not been fully explored using a genome-wide approach. Thus, in the present study, we investigated the transcriptome of breast cancer cells during the initial stages of tumoral growth using RNAseq in a model of Multicellular Tumor Spheroids (MTS). Network analyses showed that a metastatic signature was enriched as several adhesion molecules were deregulated, including EPCAM, E-cadherin, integrins and syndecans, which were further supported by an increase in cell migration. Interestingly, we also found that the cancer cells at this stage of growth exhibited a paradoxical hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism. In addition, we found a large number of regulated (long non coding RNA) lncRNAs, several of which were co-regulated with neighboring genes. The regulatory role of some of these lncRNAs on mRNA expression was demonstrated with gain of function assays. This is the first report of an early-stage MTS transcriptome, which not only reveals a complex expression landscape, but points toward an important contribution of long non-coding RNAs in the final phenotype of three-dimensional cellular models.

Multicellular tumor spheroids (MTS) are a type of cell culture that recreates the microenvironmental, molecular, functional and histomorphological characteristics of *in vivo* tumors. MTS acquire differentiated cell-cell junctions and a defined microenvironment. Later, the MTS grow to diameters between 200 and 500 μM , form defined gradients of nutrients and oxygen, and establish a central apoptotic/necrotic area as they reach sizes larger than 500 μM ¹. The initial growth phase of the MTS is reminiscent of the small avascular growth during the initial growth of primary tumor and metastasized cells. The cell-cell interactions and microenvironment of these structures results in multicellular resistance, a well-defined phenotypic change that is also present in tumors *in vivo*², and causes enhanced invasion and migration, as well as an increased clonogenic capacity. Although earlier studies have reported that phenotypic changes in MTS are associated with modulation of cellular transcription, relatively few studies have been conducted that analyze gene expression in MTS. Francia *et al.*³ performed differential display to find genes regulated in MTS and identified a network of expression that suppressed DNA mismatch repair and was responsible for multicellular resistance to alkylating agents³. Similarly, Zhou *et al.*⁴ used dynamic array device integrating microfluidic circuits to analyze gene expression in MTS and found changes

¹Epigenetics, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur No. 4809, Col Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P 14610. ²Functional Genomics laboratories, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur No. 4809, Col Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P 14610. ³Microbial Molecular Immunology Program, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), University City Avenue 3000 C.P. 04510, Coyoacan, Mexico City. ⁴Department of Molecular Genetics, Institute of Cellular Physiology (UNAM), University City Avenue 3000 C.P. 04510, Coyoacan, Mexico City. ⁵Posgraduate Program in Biological Sciences, Faculty of Medicine (UNAM), University City Avenue 3000 C.P. 04510, Coyoacan, Mexico City. ⁶Unit of Biochemistry, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán (INCMNSZ), Av. Vasco de Quiroga N° 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan. CP.14080, México D. F., México. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.M. (email: vilmaml@gmail.com)

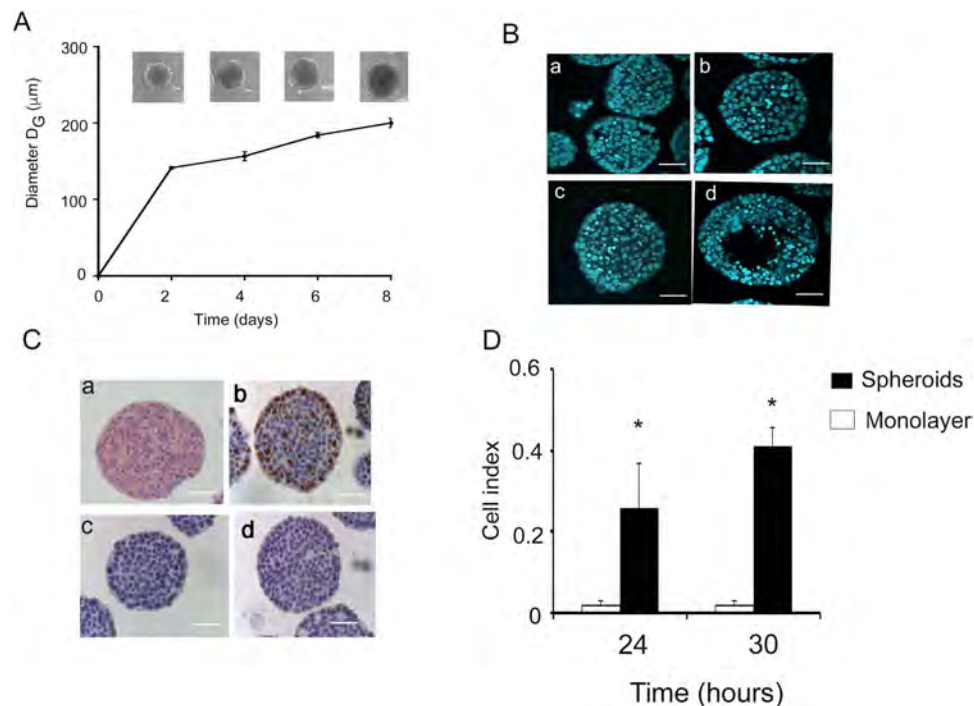


Figure 1. Growth and characterization of MTS. (A) Growth kinetics of MTS at 2, 4, 6 and 8 days of culture. \pm SD $n = 3$, (B) Nuclei of cells of MTS at 2, 4, 6 and 8 days stained with DAPI (panel a, b, c and d respectively). (C) Six-day spheroids stained with H&E (a); and immunostaining with Ki67 (b); p27Kip1 (c); HIF1 α (d). (D) Migration data monolayers vs spheroids disaggregated. The mean geometric diameter D_G . Scale bar = 50 μm .

in cellular senescence and glucose metabolism genes⁴. Nevertheless, there are no genome-wide analyses to date characterizing early stage MTS.

MTS model is frequently used to analyze the effectiveness of anticancer drugs because for many chemotherapeutic drugs this model provides a well-established solid tissue environment that is associated with multicellular resistance, which is a better reflection of *in vivo* conditions^{5,6}.

Long non-coding RNAs (lncRNAs) belong to a group of molecules without protein coding potential that range widely in size, from 200 to 10000 nucleotides. Similar to messenger RNAs, lncRNAs are transcribed by RNA polymerase II, 5' capped, spliced and polyadenylated at the 3' end⁷. lncRNAs play a pivotal role in the regulation of gene expression at several cellular levels, including the organization of nuclear sub-structures, the modulation of chromatin states, transcription and post-transcriptional processing⁸. In addition, lncRNAs can function as co-factors of proteins, messenger RNA stabilizers, miRNAs regulators, or translation modulators^{9,10}. The prevalence of lncRNAs is a subject of current debate, with large differences found depending in the technique used to identify them, and the particular definition used for their characterization. For example, Kaessmann H, *et al.* in 2014 identified all the lncRNAs of 11 tetrapod species and found 11000 lncRNAs in primates (almost 15000 in human) with 2500 of them highly conserved¹¹. Given the recent identification of most lncRNAs, and their sheer number, their specific molecular functions remain unknown. Nevertheless, the importance of lncRNAs can be inferred due to their tissue-specific expression and specific regulation in diverse cellular processes, in both physiological and pathological conditions, such as genomic imprinting¹², development¹³, pluripotency maintenance¹⁴, neurodegenerative disorders¹⁵, cardiovascular diseases¹⁶ and cancer¹⁷.

To gain more insight into the involvement of lncRNAs and mRNA in the cancer-associated phenotype at the early stages of tumoral and metastatic growth, we used small MTS with a size of <200 microns, which exhibit the classical multicellular resistance phenotype, to perform whole-genome transcriptome analyses.

Results

Characterization of MTS. We were interested in analyzing the MTS that most closely mimic *in vivo* avascular tumors, because these MTS more accurately reflect the initial steps of cancer and micro-metastasis. For this, we initially characterized MTS cultivated during a eight-day course. As shown in Fig. 1A, MTS cultured for six days exhibited diameters of $\pm 200 \mu\text{m}$, with only a small percentage of condensate (apoptotic) nuclei, similar to day 2 and 4 (Fig. 1B, panel a–c). This is consistent with previous reports that showed that hypoxic conditions generally start in the central areas of MTS when approaching 200–250 microns in diameter¹. In some MTS, this stratification was evident at 8 days, as shown in Fig. 1B, panel d. To further characterize the functional dynamics of the MTS, we quantified cell proliferation using Ki67 immunocytochemistry. Ki67 is a nuclear protein that is present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2 and mitosis) but is absent from resting cells (G0). Figure 1C, panel b, shows that approximately 40% of the cells were positive for this nuclear protein. In addition,

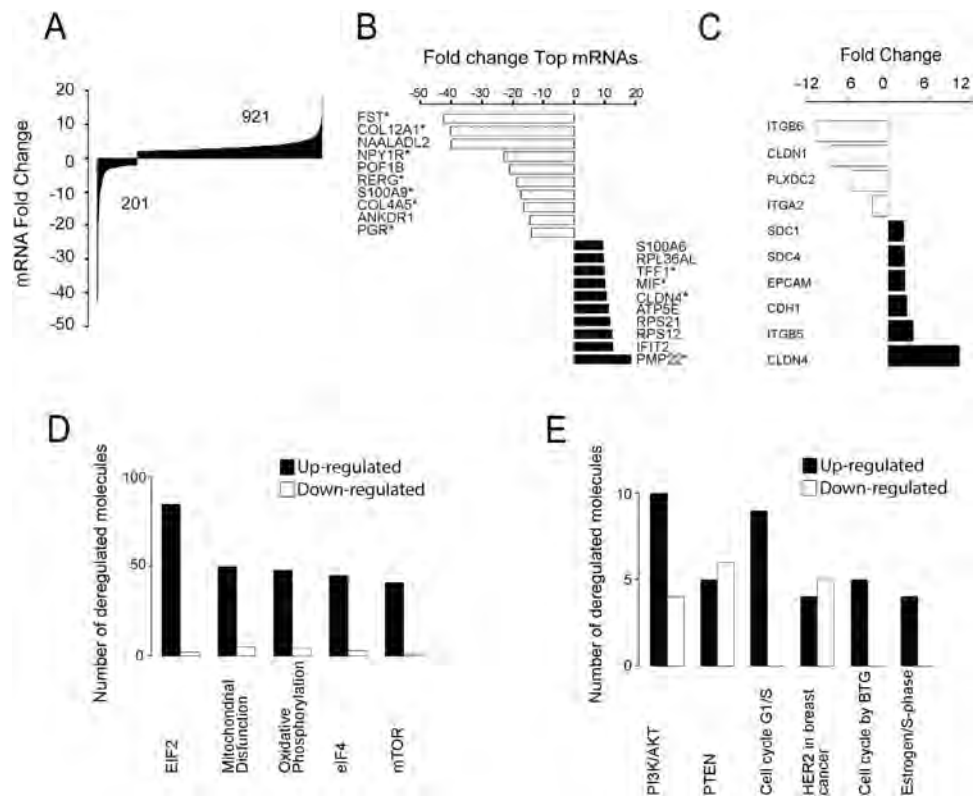


Figure 2. Analysis of the differentially expressed mRNAs in MTS using RNA sequencing. (A) Fold change of all mRNAs dysregulated. (B) Top ten of dysregulated mRNAs analyzed with IPA, * Genes related to breast cancer metastasis. (C) Fold change of mRNAs associated with cell adhesion. (D) Top five canonical pathways and (E) pathways associated with cell cycle using the IPA software.

we found that approximately 60% of cells were positive for the cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27Kip1) (Fig. 1C panel c), an enzyme inhibitor that regulates G0-to-S-phase transition.

As expected, at day 6 we could not identify expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1 α), the main transcription factor that regulates hypoxia (Fig. 1C, panel d). In conclusion, we found that, at six days, MTS were already well-consolidated, in contrast to the previous days, during which the MTS were just cell aggregates that dislodge easily. At this early timepoint there is no stratification, no hypoxic areas, and more importantly, no evidence of cell death at the center of the MTS, in contrast to later timepoints. For these reasons, we selected the six-day timepoint for all our experiments.

Migration ability of cells grown as MTS. Since active migration of tumor cells is a prerequisite for metastasis, we evaluated this ability in cells derived from MTS using the xCELLigence technique. As shown in Fig. 1D, MCF7 cells grown as MTS increased their ability to migrate by 10 times, when compared with cells grown as monolayer cultures (Table S2).

Genome-wide expression analysis. To gain insight into the non-coding and coding RNA transcriptome that drives the early MTS culture, we performed a differential expression analysis using RNASeq in six-day MTS versus monolayer cultures.

Coding RNA. In our analysis, we found 1122 dysregulated transcripts. Nine-hundred and twenty-one transcripts increased their expression; we found that 201 transcripts were regulated down-regulated and three of them (ANKRD30A, HBB and TCN1) were expressed only in monolayer cultures (Fig. 2A)

In Fig. 2B we show the top 20 (up and down) regulated genes. All them were associated with breast cancer and eleven have been associated with breast cancer metastasis (Table S3).

Interestingly, we found important differences in a group of 10 mRNAs that code for membrane proteins, which could be a reflection of the MTS consolidation at this stage. For example, we detected a robust decrease in Claudin 1 (CLDN1), Plexin 2 (PLXDC2), Integrin beta 6 (ITGB6), Integrin alpha 2 (ITGA2) and an increase in E-cadherin (CDH1), Integrin beta 5 (ITGB5), Claudin 4 (CLDN4), EPCAM and transmembrane proteoglycans such as syndecans (SDC1 and SDC4) in MTS (Fig. 2C).

To gain a global perspective on the main cellular processes modulated, we analyzed our data using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Using this tool, we found several dysregulated networks, with the top five dysregulated networks being Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Phosphorylation, EIF2 Signaling, Regulation of eIF4 and p70S6K and mTOR Signaling (Fig. 2D, Table S4 and Fig. S2). Additionally, we identified some interesting

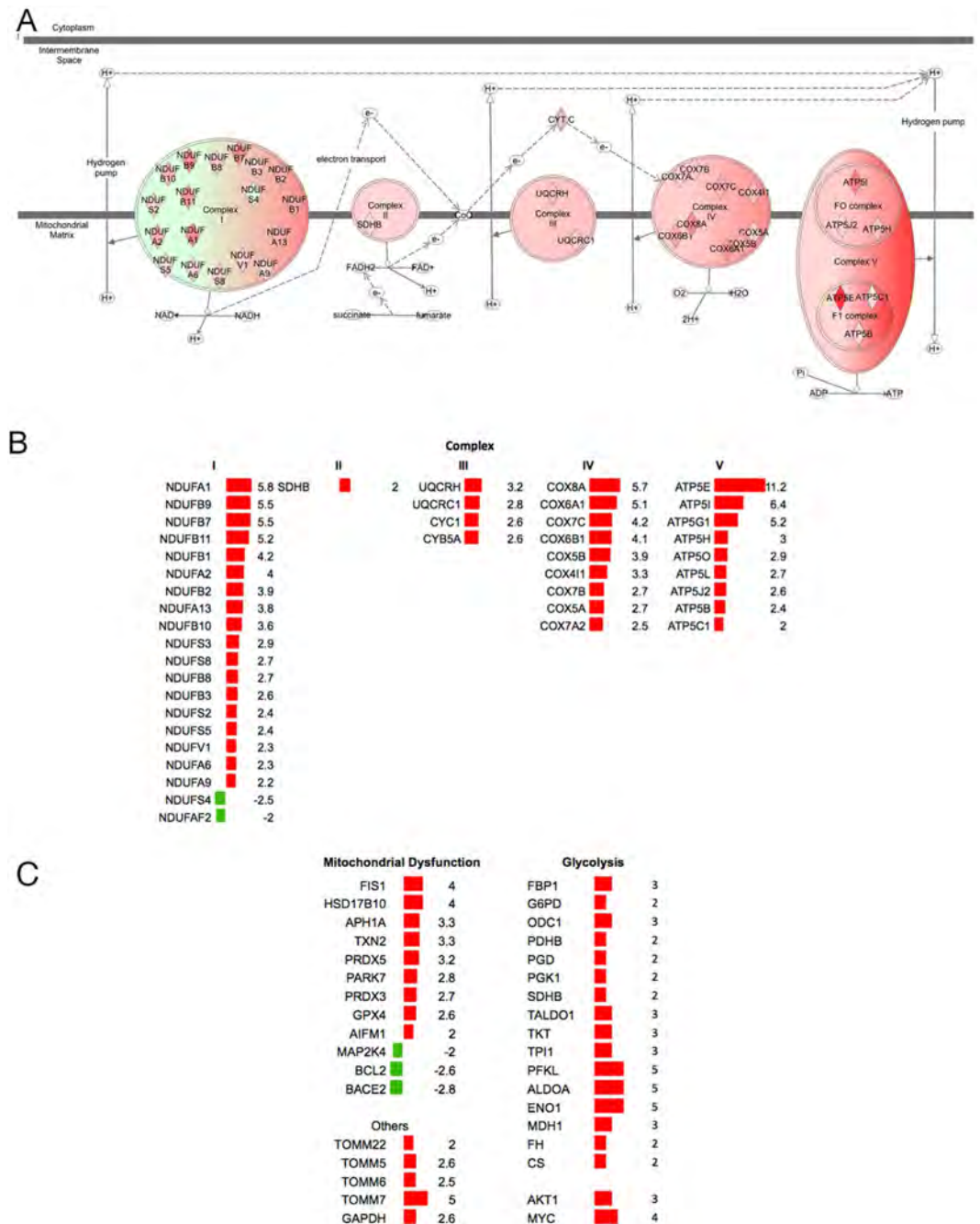


Figure 3. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in MTS. (A) mitochondrial mRNAs dysregulated in five oxidative phosphorylation complexes. **(B)** Fold change of mRNAs dysregulated in the five oxidative phosphorylation complexes. **(C)** Fold change of mRNAs mitochondrial dysfunction proteins and other proteins and glycolysis genes. Red color = up-regulation and green color = down-regulation.

pathways associated with the cell cycle, such as estrogen-mediated S-phase entry, HER-2 signaling in breast cancer, cell cycle G1/S checkpoint regulation, cell cycle regulation by BTG family protein, PI3K/AKT and PTEN signaling (Fig. 2E). Supplementary Table S5 shows the up and down regulated molecules associated with cell cycle pathways, and an image of the canonical pathways (Fig. S3). Some other canonical pathways related to other cellular processes are also included, such as cell survival, cell adhesion and ubiquitination (Fig. S4).

Energy metabolism networks, including mitochondrial dysfunction and oxidative phosphorylation, had 55 and 42 dysregulated genes, respectively (Table S4). These include proteins of complex I (NADH, NDUF), complex II (SDHB), complex III (UQCRC1, UQCRH), complex IV (various isoforms of COX) and complex V (F₁F₀-ATP synthase) (Fig. 3A,B Table S4 and Fig. S2), mitochondrial dysfunction proteins (Fig. 3C), as well as some other proteins associated with mitochondrial transport, such as TOMM22, TOMM5, TOMM6 and TOMM7 (Fig. 3C). In addition, we identified several upregulated genes involved in glycolysis (ENO1, FBP1, G6PD, GAPDH, ODC1,

	Monolayer cells	6-day MTS
Basal respiration (B.R.) ^a	5.2 ± 2	10.3 ± 2.7***
+ 5 μM oligomycin	1.7 ± 0.4	3 ± 0.4**
+ 1 mM NaCN ^b	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3
OxPhos flux ^c	3.5 ± 1.8	7.3 ± 2.5**
Uncoupled respiration (U) ^d	7.1 ± 1.1	17.2 ± 1.6**
U/B.R.	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1*

Table 1. Rates of oxygen consumption and OxPhos flux in MCF-7 monolayer and 6-day MTS. All values are shown in ngAO/min/10⁶ cells. Data from five independent experiments are expressed as the mean ± SD. *t*-tests for paired data: * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005. ^aBasal respiration was determined in the absence of exogenous electron donors or carbon sources. ^bNaCN was added to full inhibit mitochondrial oxygen consumption. ^cOxPhos flux = Basal respiration rate - rate of oxygen consumption in the presence of oligomycin. ^dUncoupled respiration (U) was induced with 6 μM CCCP.

PDHB, PGD, PGK1, SDHB, TALDO1, TKT, TPI1, PFKL and ALDOA) as well as AKT1 and MYC, which have been reported as glucose metabolism regulators¹⁸ (Fig. 3C right panel).

This suggests that a mitochondrial/oxidative phosphorylation gene expression cassette is over-activated in the early stages of MTS.

MCF-7 early-stage MTS exhibit a hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism. To corroborate the changes we found in the oxidative phosphorylation system (OxPhos), we measured the rate of oxygen consumption and the OxPhos flux. Cells from early-stage MCF-7 MTS exhibited a two-fold increase in basal respiration with respect to monolayer cells (Table 1). When OxPhos flux was unveiled by adding oligomycin (a specific F₁F₀-ATP synthase inhibitor), we observed that MCF-7 MTS had a 2-fold increase in ATP synthesis-coupled respiration with respect to monolayer cells (Table 1). In addition, adding the protonophore CCCP to the reaction chamber induced maximal uncoupled respiratory activity. This molecule dissipates the mitochondrial electrochemical proton gradient ($\Delta\mu_{H^+}$) and stimulates respiration to its maximum value. Once again, MTS exhibited a higher increase of oxygen consumption than monolayer cells, 17.2 ± 1.6 vs. 7.1 ± 1.1 ngAO·min⁻¹·(1 × 10⁶ cells)⁻¹, respectively (Table 1). A good parameter to estimate mitochondrial coupling is the ratio between the uncoupled respiration and basal respiration (U/B.R.). U/B.R. respiration values for MCF-7 MTS and monolayer cells were ~1.7 and ~1.3, respectively (Table 1). All of these results suggest that the mitochondria of MTS have higher OxPhos activity, i.e., a higher ATP synthesis coupled to higher respiratory chain activity (hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism).

Changes in the cell cycle. We also found enrichment of different pathways that affect the cell cycle. To validate this, we analyzed the cell cycle using flow cytometry and found that MTS had a substantial decrease in the number of cells found in the synthesis (S) and the Gap2 (G2) phases, with a concomitant increase in the number of cells in the Gap1 (G1) phase (Fig. 4A). The candidate molecules that could be regulating this phenotype in our experimental model were Tp53 Change to TP53, cMYC, p27KIP1 (CDKN1B), MAX/cMyc and CDK4, which were also involved in cell cycle G1/S checkpoint regulation (Fig. 4B, Table S5 and Fig. S3A) and in estrogen-mediated S-phase entry pathways (Fig. 4C, Table S5 and S3B). See Supplementary Table S5 and Fig. S3 for additional pathways.

Long non-coding RNAs. We then analyzed the expression of lncRNA transcripts in early-stage MTS. Fig. 5A,B show that 1502 lncRNAs were regulated, a very similar number to the total mRNAs altered (1122) (Fig. 5F). Eight-hundred and sixty-six lncRNAs (58%) were regulated positively (Fig. 5B,F), of which 390 were synthesized *de novo* in the MTS, as assessed with our methodology (Fig. 5B). Six-hundred and thirty-six lncRNAs (42%) were regulated negatively, of which 398 ceased to be expressed completely during the 6 days of MTS culture (Fig. 5F,B). We found a higher percentage of coding transcripts that were upregulated 82% (versus 58%) and downregulated 18% (versus 42%) (Fig. 5F).

In addition to this regulation, lncRNAs exhibited greater expression fold changes (up to 50-fold), in contrast to mRNAs (up to 5 fold), and nearly half of these lncRNAs were regulated in a binary manner (switched off completely or expressed *de novo*) (Fig. 5E).

Sixty-percent of the regulated lncRNAs (906) had a length of less than 1000 nt, 27% (403) were between 1000 to 2499 nt, and only 12% (172) were larger than 2500 nt (Fig. 5C). Notably, no differences were found in the strand transcribed for the regulated lncRNAs, 767 lncRNAs originated from the positive strand versus 735 from the negative strand, which was similar to all the lncRNAs (58271 positive strand and 53339 negative strand). The Chi-square test was equal to 0.0011 degrees of freedom and a *p*-value = 0.98172. In Fig. 5D, we present the top 10 positive and negative regulated lncRNAs in the MTS. lnc-TCL1B-1:1 was the most up regulated molecule, with a fold change of 59, whereas the most down regulated lncRNA was lnc-FCGR1B-1:1 with a fold change of -15.

With these data, we then sought to determine whether there were differences in the chromosomal localization of the regulated lncRNAs and mRNAs. In Fig. 6A, we show the distribution of dysregulated transcripts. No correlation was found between the number of mRNAs dysregulated and the length of each chromosome (*R* = 0.55), but, as expected, we found a good correlation between the numbers of regulated mRNAs versus the number of all described mRNAs present per chromosome (density) (*R* = 0.95) (Fig. 6C). Similarly, for lncRNAs, we also did not

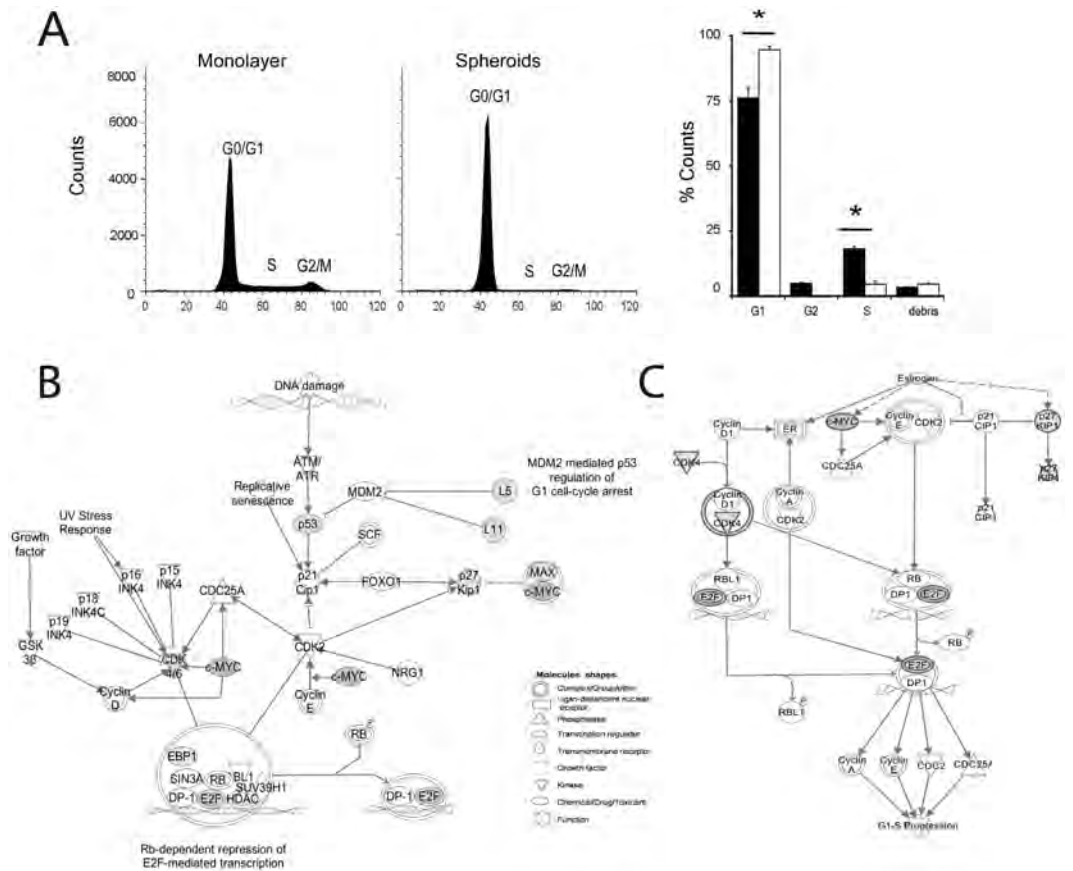


Figure 4. Cell-cycle measured in MTS using flow cytometry. (A) Analysis of the cell-cycle. * $p < 0.05$ $n = 3$ t -test. (B,C) Canonical pathways; G1/S checkpoint regulation and estrogen-mediated S phase. Entry (IPA). Interaction — Direct, - - - Indirect, \rightarrow Modulation, \rightarrow Inhibiting or/and ubiquitination, \rightarrow Inhibits and acts on, \rightarrow Reaction Gray colors up-regulation and intensity indicates the magnitude of change.

find a correlation between the number of regulated lncRNAs MTS along each chromosome ($R = 0.69$) (Fig. 6C), or their density per chromosome ($R = 0.67$) (Fig. 6C). In addition, we did not find a correlation between the number of regulated mRNAs and lncRNAs. Although both groups of RNAs are transcribed by RNA polymerase II, and the number of coding RNAs is very similar to the number of lncRNAs in each chromosome (Fig. 6B), we found that the number of lncRNAs and mRNAs regulated per chromosome were rather different in MTS, indicating a different regulation process for each group of transcripts (Fig. 6A).

Although lncRNAs are able to regulate genes located thousands of base pairs away, most of them carry out their function in nearby genes¹⁹. For this reason, we localized the nearest coding genes to the regulated lncRNAs and looked for co-regulation. Supplementary Table S6 shows the fold change and localization of 63 co-regulated lncRNAs and mRNAs in MTS cultivated for six days (Fig. 7A). We found 35 positively dysregulated lncRNA whose nearby genes were also increased (Fig. 7B). One of the most interesting was PMP22, which has been associated with breast cancer metastasis²⁰. We found two lncRNAs with a concordant lower expression of their mRNA neighbors, CHD2 and LRBA (Fig. 7B). We also found 20 lncRNAs with an inverse expression pattern (Fig. 7C). Interestingly, 5 of these co-regulated lncRNAs were dysregulated with two neighboring genes that were also dysregulated (lncRNA-ADI1-2:1, lncRNA-HIST1H2AG-2:1, lncRNA-HIATL1-4:1, lncRNA-ARL15-1:1 and lncRNA-GGCT-1:21), and lncRNA-GAPDH with three neighboring dysregulated genes (GAPDH, NOP2 and MRPL51), indicating that this effect of lncRNA is possibly widespread (Fig. 8A).

We then sought to identify clusters of co-regulated genes in our data. As shown in Fig. 8B, we found three clusters located on chromosome 1, 6 and 12. These included two very interesting regulated histone clusters. The first was in chromosome 1, in which 4 modulated histone mRNAs are surrounded by several lncRNAs, and the second was in chromosome 6, with 25 histone genes, including HISTH2, HISTH3 and HISTH4, surrounded by several dysregulated lncRNAs (lnc-ZNF192-1:1, lnc-HIST1H2AG-2:1, lnc-HMGN4-1:1 and lnc-PRL-7:1) (Fig. 8B).

Correlation between RNAm/lncRNA networks. It has been described that lncRNAs are able to regulate adjacent genes; using this approach, we found nodes for 63 lncRNA-mRNA co-regulated we found 63 lncRNA-mRNA co-regulated nodes (instead of we found nodes for 63 lncRNA-mRNA co-regulated) (previously mentioned). The main regulated biological network enriched in these nodes was the mTOR-signaling, MYC and HIF-1 cascade (Fig. S5).

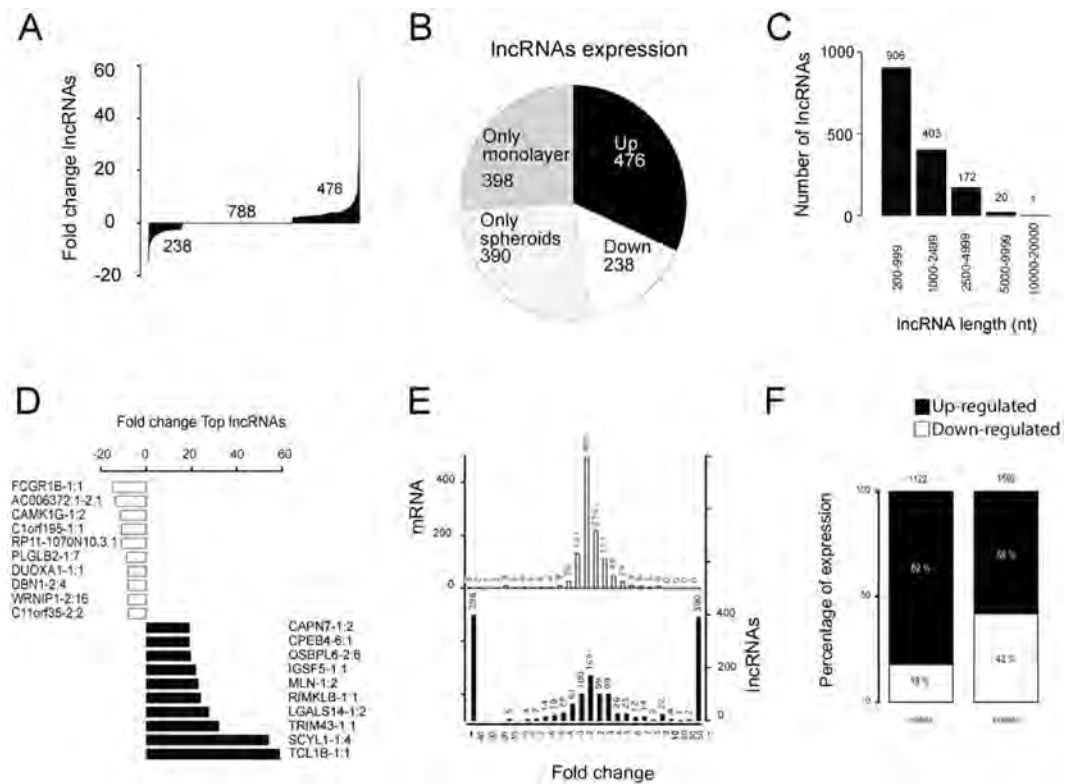


Figure 5. Analysis of the lncRNAs in MTS using RNAseq. (A) Fold change of all lncRNAs dysregulated. (B) A pie diagram of lncRNAs dysregulated included lncRNAs expressed in only one culture condition. (C) Length distribution of lncRNAs dysregulated. (D) Top ten dysregulated lncRNAs. (E) Histogram of the fold change distribution between dysregulated RNAs (F) Comparison of the lncRNAs and mRNAs dysregulated.

Since its relative recent discover, there are only a handful described functions for the vast number of lncRNAs (Table S7), and even a lower characterized molecular targets for them. Nevertheless, we sought to analyze if there was information of at least some of the found deregulated lncRNAs. We found that 14 lncRNAs with established target genes in our model. These data were used to construct an interaction network using the lncRInter-lncRNA Interaction and IPA tools. Interestingly, we found that 5 of the lincRNAs (LinC00467, MCM3AP-AST, PVT1, H19, and ZFas) converge at a MYC node and 6 more (PVT1, MALAT, GAS5, TPTG1, MEG3 y TUG1) converge at a p53 node, as shown in Fig. S6.

Validation of mRNAs and lncRNAs. When we validated 8mRNAs and 10 lncRNAs using qPCR, find success rate of 75 % for RNAs and 80 % for lncRNAs (Fig. 9B and C respectively). The values obtained by qPCR are shown in supplementary table S8 (Fig. 9A–C). And to (instead of And to) assess the importance of these expressional changes, four pairs of lncRNAs/mRNAs pairs (lnc-GAPDH-2:1/GAPDH, lnc-HIST1H2AG-2:1/HIST1H2AG, lnc-MYC-2:24,2:5/MYC and lncANKDR30A/ANKDR30A) were validated by qRT-PCR (Fig. 9C). We were able to validate the co-regulation of three pairs, and failed to establish a co-regulation for the lncANKDR30A/ANKDR30A pair due to a large biological variability. To further support these results, we transiently overexpressed these four lncRNAs. Interestingly, we were able to reproduce the co-regulation in three lncRNA/mRNA pairs, which not only supports a possible new cis-acting function for these lncRNAs, but also validates our co-regulation approach for determining new lncRNAs targets (Fig. 9D,E and Table S9).

Discussion

MTS represent an excellent model to study cancer biology because they mimic the behavior of tumors *in vivo*. Many of the phenotypic characteristics of cells grown in MTS are a consequence of gradients of nutrients and oxygen, which produces zonal heterogeneity and, in mature MTS, several cellular layers, an outer layer with proliferative cells, an intermediate layer containing quiescent cells and a central necrotic/apoptotic area. Nevertheless, avascular primary tumors and micro-metastasis are more accurately modeled by early stage MTS, in which the poor-hostile microenvironment of oxygen and nutrients are not properly established and most of the phenotype is derived by the presence of 3D cellular and extracellular matrix interactions.

To gain greater insight into the molecular mechanisms that are regulated during these early stages, we studied MTS with a diameter of approximately 200 microns in which there is no HIF1 α expression, indicating the absence of hypoxia. To further validate our model, we analyzed the expression of p27Kip1, a protein that blocks the cell cycle at the G1/S phase checkpoint and is highly expressed in cells arrested at the G0 and G1 phases. p27Kip1 expression was limited to sparse cells, without forming a clear middle layer in the MTS, as would be

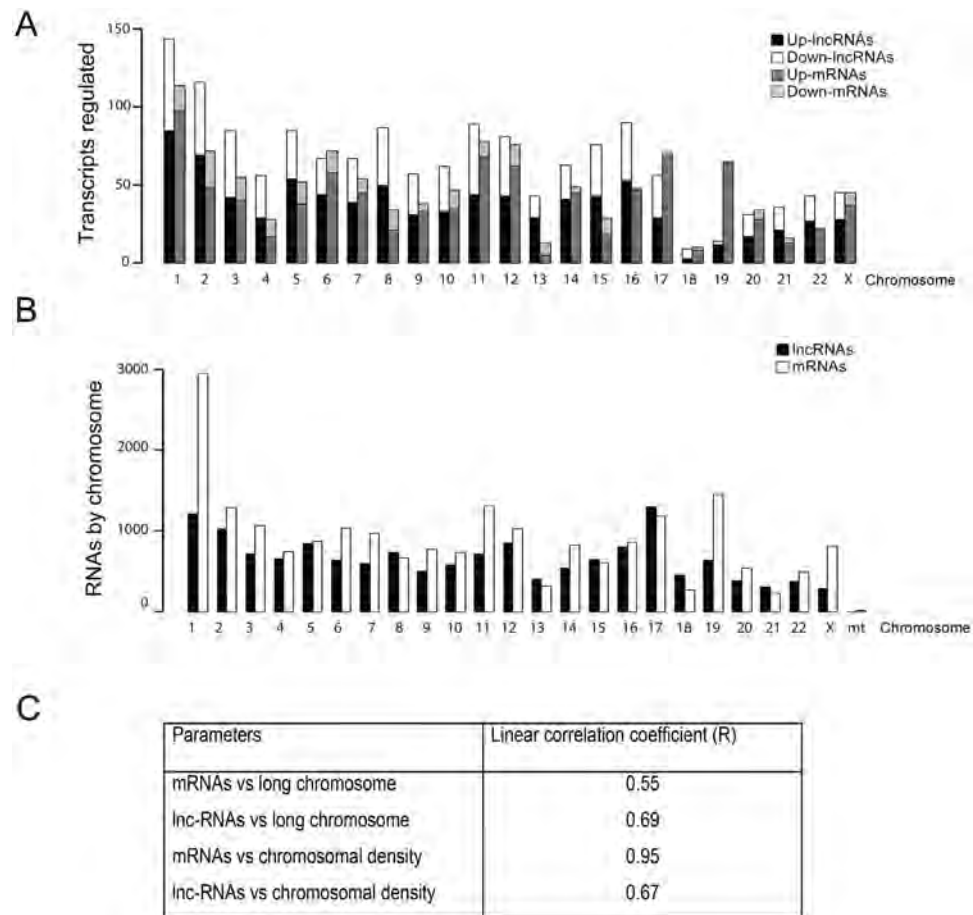


Figure 6. Distribution of lncRNAs and mRNAs differentially expressed by chromosome. (A) Up- and down-regulated mRNAs and lncRNAs dysregulated in MTS by chromosome. (B) Total lncRNAs and mRNAs by chromosome: Ensembl (<http://www.emsembl.org/index.html>). (C) Linear correlation coefficient (R) of mRNAs and lncRNAs according to length or chromosomal density.

expected in a hypoxic layer that is rich in quiescent cells of mature MTS. In our model, increased p27Kip1 expression in sparse cells could be induced by cell–cell contact²¹. In addition to this, we measured Ki67, a nuclear protein that is present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2 and mitosis), but absent from resting cells (G0). As expected, Ki67 positive cells were mainly located in the external layer.

We then sought to gain insight into the molecular mechanisms that could be regulated during this stage, and correlate this to the putative avascular tumor phenotype. Using massive RNA sequencing analysis we found 1122 dysregulated messenger RNAs in MTS of 6 days. As expected, among the top 20 regulated genes, all them were associated with cancer and eleven of them have been associated with breast cancer metastasis (i.e., NAALADL2, PMP22, CLDN4 and PGR) (Table S3)^{20,22–24}.

These results strongly support the relevance of our model. Because we predicted that the main drivers for the phenotype would be related to cell–cell interactions, instead of hypoxic and/or cell cycle alterations, we focused on the regulation of membrane proteins. Indeed, we found that claudins, plexin 2, several integrins, syndecans, EPCAM and E-cadherin were regulated in the MTS. E-cadherin the major cadherin implicated in epithelial cell–cell adhesion, is associated with invasion and, more interestingly, it is commonly re-expressed by metastatic cancer cells to recover the adhesion complexes that are temporarily lost during the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which is required for effective dissemination²⁵. Additionally, claudins are the major component of the tight junctions and are very important for the growth of metastatic cancer cells. For example, Abd-Elazeem M.A. and Abd-Elazeem M.A.²⁶ reported high levels of claudin 4 expression in 66.1% of triple-negative breast cancer, particularly in invasive carcinoma, which correlated with the expression of Ki67. Similarly, Jiwa LS, *et al.*²³, reported that Claudin-4 is overexpressed at high levels in breast cancer metastases and is thereby an attractive membrane bound molecular imaging and drug target^{23,26}.

EPCAM is a transmembrane glycoprotein that plays an important role in carcinogenesis in many tumor types, including breast carcinoma, where high EPCAM expression is associated with larger tumors, nodal metastasis and worse survival^{27,28}. Syndecans are members of the syndecan-proteoglycan family involved in cell binding and signaling and cytoskeletal organization. Syndecan-1 plays a vital role in regulating essential physiologic cellular functions, including proliferation and differentiation. This molecule is also involved in oncogenesis and metastatic dissemination of various malignant epithelial neoplasms, including breast cancer^{29,30}. The changes in

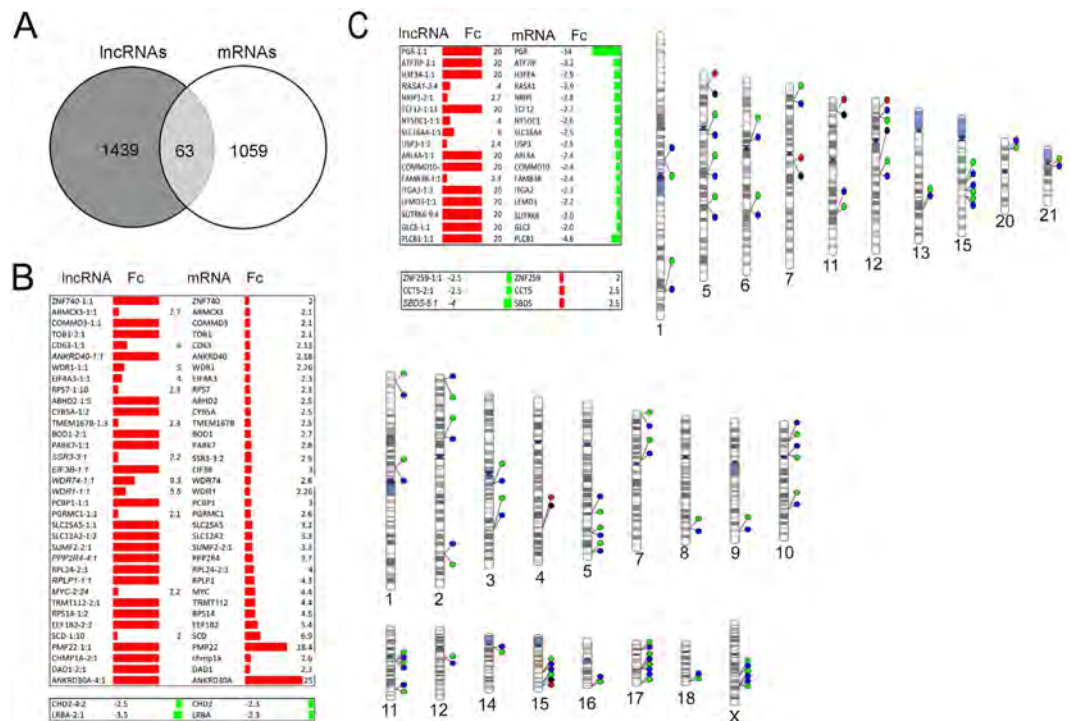


Figure 7. Relationship between dysregulated lncRNAs and neighbor mRNAs in MTS. (A) Venn diagram of 63 matching transcripts between mRNAs and lncRNAs according to their name in the LNCipedia database (isoforms of lncRNAs not included) (B) lncRNAs and neighboring mRNAs regulated in the same direction and phenogram. (C) lncRNAs and neighboring mRNAs genes regulated in opposite direction and phenogram. Fc = Fold change.

adhesion molecules could be playing a central role in the early stages of avascular tumors and micro-metastasis, as in our model. We observed that the disaggregated spheroid cells showed a pattern of migration.

Previous research has extensively shown that cancer cells produce energy predominantly through a high rate of glycolysis, followed by cytosolic lactic acid production, as opposed to oxidation of pyruvate in mitochondria, a phenomenon termed the Warburg Effect³¹. Interestingly, we found a paradoxical respiratory increase in our model. Two pathways were associated with overactive oxidative phosphorylation in mitochondria and mitochondrial dysfunction that included 55 mitochondrial genes (Table S4). We corroborated this result by measuring mitochondrial respiration and found that it increased two-fold in MTS. This hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism has been described in microenvironment-regulated tumor metabolism, where tumor stroma and adjacent host tissues are catabolic, and as a consequence, cancer cells are anabolic^{32–34}. In this model, energy is transferred from the catabolic compartment to the anabolic compartment via sharing of nutrients (onco-metabolites) that promote tumor growth. The two-compartment tumor metabolism model has been demonstrated in fibroblasts and breast cancer cells, and more recently between adipocytes and ovarian cancer cells³⁵. This effect can be phenocopied by incubating cancer cells alone with L-lactate³⁴.

This is the first report that fully analyzed the transcriptome of early (6 days) MTS stages. Among the results, we found that 55 dysregulated genes were associated with mitochondria. Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2008 reported that in intermediate-stage MTS (11 day) the ATP supply was provided by both energy pathways (OxPhos and glycolysis) and, at this stage, the OxPhos flux was similar to that observed in cells cultured as monolayers and it decreased in older spheroids (15 days) in which the glycolysis increased significantly, reproducing the Warburg effect³⁶. The present results, showing an increase of oxidative phosphorylation at very early stages and deregulation of several metastatic genes and increased cellular migration suggest that both processes are linked. The use of early stage spheroids would be a good model for initial metastatic seeding.

Energy production is strongly associated with tumor cell processes such as apoptosis, metastasis and chemo resistance. The activation of OxPhos complexes provides an opportunity to use specific drugs directed toward these complexes for an antineoplastic effect. For example, metformin behaves as a weak mitochondrial poison because of its Complex I inhibitor activity, and metformin has been evaluated as an anti-cancer agent in pre-clinical animal models. Similarly, both malonate, which inhibits Complex II and azide, which is an inhibitor of Complex IV could be further developed for clinical testing. In the present report we also found a deregulation of genes associated with glycolysis, although to a lesser extent to OxPhos genes. It will be of great interest to analyze the relative participation of each process in the full energy metabolism of early-stage MTS, since this could have clinical implications.

Because the small size of the MTS precludes the presence of hypoxia, we hypothesize that these changes are mainly based on changes in the number and types of cell-cell interactions and the microenvironment. This

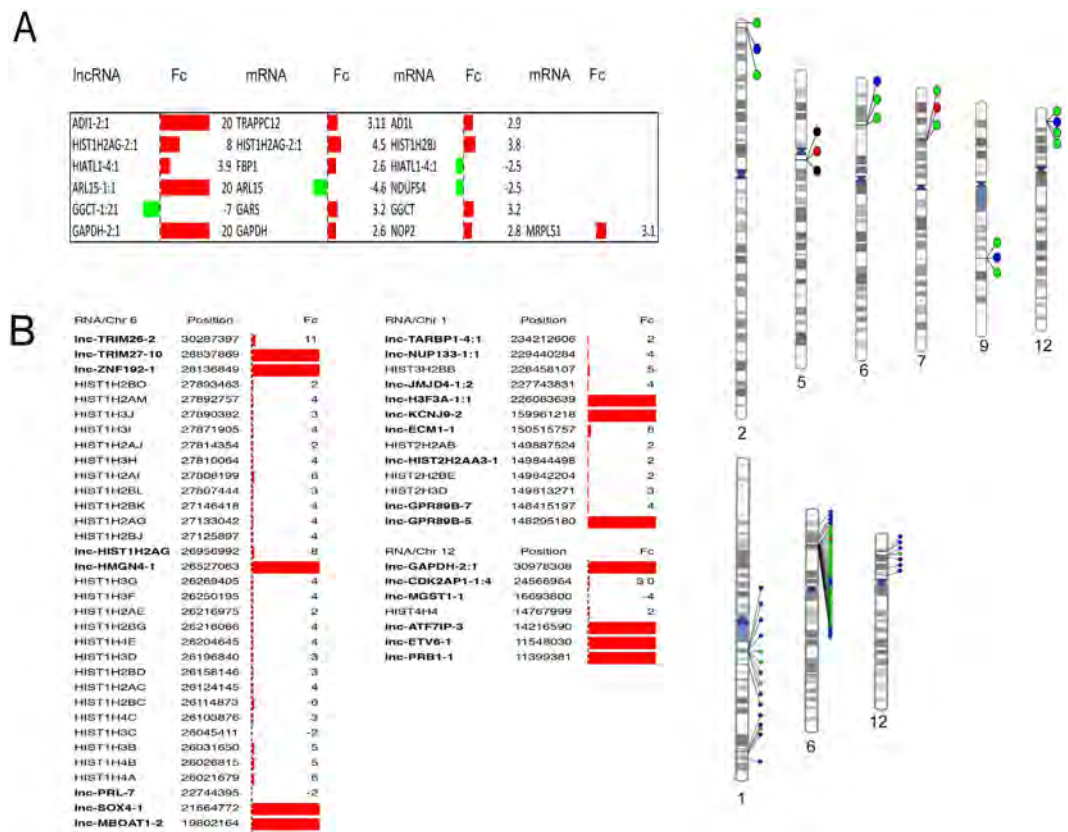


Figure 8. Relationship between dysregulated lncRNAs and neighbors mRNAs in MTS as assessed using the Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute). (A) lncRNAs with more than one neighbor mRNA regulated and the corresponding phenogram. (B) lncRNAs neighboring to histone cluster regulated in spheroid and the phenogram. Fc = Fold change.

latter change would be the result of the presence of new metabolites and/or pH changes that are being generated. Further experiments are needed to test the relative contribution of each phenomenon.

We also sought to investigate whether the three-dimensional structure could be affecting the expression of lncRNAs. Our analyses found a similar number of dysregulated lncRNAs and mRNAs. Many of these were synthesized *de novo* or downregulated to non-detectable levels. This binary behavior contrasted with mRNA expression patterns in which a wide range of expression changes was found. In addition, lncRNAs are less abundant than coding RNAs. Arjun Raj *et al.*, 2015, when analyzing the distribution of single cell counts, demonstrated the relatively low overall expression of lncRNAs, with 43% of lncRNA-cell pairs having 10 or fewer molecules per cell on average and with a median of 14 molecules across all gene-cell-pair distribution medians (vs 36 for the 49 mRNA-cell pairs we examined)³⁷. This finding could account for the binary behavior of lncRNAs.

Previous research has shown that although lncRNAs are able to regulate genes located thousands of base pairs away, most of them carry out their function in nearby genes¹⁹. For this reason, we located the nearest coding genes to the regulated lncRNAs and looked for co-regulation. We found 63 co-regulated lncRNAs and mRNAs. Of these, 35 were positively co-regulated, and one is particularly of interest. PMP22 is a messenger RNA that has been associated with breast cancer and metastasis²⁰. Twenty lncRNAs had a change in the opposite direction with regards to a neighboring gene (Fig. 7C), and six lncRNAs (Fig. 8A) were co-regulated with two or three neighbor genes. Among these, lnc-GAPDH was co-regulated with three neighbor genes (GAPDH, MRPL51 and NOP2). GAPDH is an enzyme that, in addition to catalyzing the sixth step of glycolysis in the cytoplasm, has been shown to be involved in many cellular processes, including DNA repair, tRNA export, membrane fusion and transport, cytoskeletal dynamics and cell death. Interestingly, GAPDH has been found in particulate fractions of mitochondria with low levels that are rapidly increased under stressed conditions, such as serum deprivation and exposure to DNA-damaging agents^{38,39}. Mitochondrial GAPDH interacts with voltage-dependent anion channel 1 and regulates mitochondrial membrane potential and cell survival⁴⁰. Previous research has demonstrated that rotenone, a common mitochondrial complex I inhibitor, induces GAPDH enrichment in particulate fractions⁴⁰. Further work is needed to assess whether lnc-GAPDH, which was one of the most dysregulated lncRNAs, could be concomitantly regulating the expression of all or at least some of its neighbor dysregulated genes.

Of particular interest, due to finding hyperactivation of OxPhos, is the coregulation of several lncRNAs and neighboring genes that are associated with mitochondrial function, including Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT)⁴¹, Shwachman-Bodian-Diamond syndrome SBDS⁴², Parkinson protein 7, PARK7⁴³, progesterone receptor PGR⁴⁴, Cytochrome b type B (CYB5B)⁴⁵, ribosomal protein S14⁴⁶, ADP-ribosylation factor/ARF-like protein 4

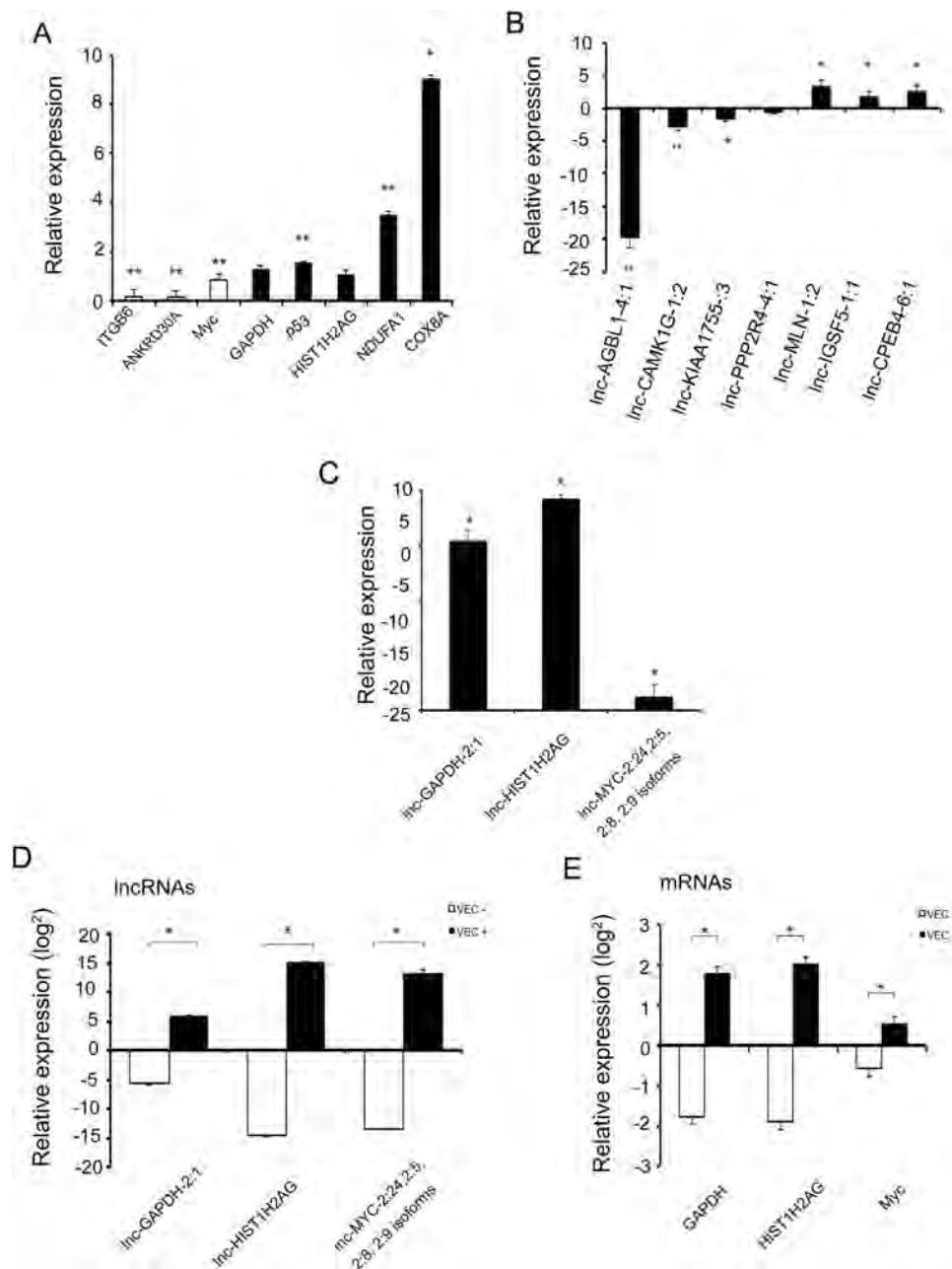


Figure 9. qPCR validation of lncRNAs and mRNAs of sequencing data and effect on mRNAs after of the lncRNAs overexpression. (A,B) qPCR validation of mRNAs and lncRNAs respectively. (C) qPCR validation of lncRNAs for cloning assays. (D,E) Level of lncRNAs and mRNAs following transfection with lncRNAs (VEC+) or empty vector (VEC-) for qPCR. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$.

(ARF4/ARL4)⁴⁷ and Solute Carrier Family 12 (Sodium/Potassium/Chloride Transporter), Member 2⁴⁸. Finally, it is worth mentioning that we identified three co-regulated lnc-messenger RNA histone clusters on chromosomes 1, 6 and 12. These lncRNAs could be operating as enhancer-lncRNAs. Further molecular work is needed to evaluate this idea.

Finally the analysis of the interaction between the two networks mRNA and lncRNA we found that 14 lncRNAs which their molecular targets are known, 5 of them converge in MYC network and 6 converge in p53 network.

In summary, in this study we describe the coding and non-coding transcriptome of early breast cancer MTS three main groups of genes were dysregulated in this experimental model. The first set involved membrane proteins implicated in cell-cell junctions, such as claudins, plexin2, integrins, syndecans, EPCAM and E-cadherin. In addition to a migration pattern in cells spheroids. The second set involved metastasis genes, and the third set consisted of genes belonging to mitochondrial complexes. The regulation of these genes was associated with hyperactivation of OxPhos, which was confirmed in functional assays. In addition to coding RNAs, we found a

clear deregulation of several lncRNAs, mostly in a binary mode. Several lncRNAs were co-regulated with neighboring genes, pointing toward new avenues for research. In particular histone coding and non-coding RNAs on three chromosomes were co-regulated, which is of interest to explore further.

Materials and Methods

Cell line culture. Breast cancer cells (MCF-7) obtained from the American Type Culture Collection # HTB-22 (ATCC, Manassa, VA, USA) were cultured in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) containing 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate (ATCC #30-2003), supplemented with 5% fetal bovine serum (ATCC #30-2020), 100 I.U./ml penicillin and 5 µg/ml streptomycin (ATCC #30-2300), at 37 °C in 5% CO₂.

Generation of MTS. MT formation of the MCF-7 cell line was performed using the liquid overlay technique with some modifications⁴⁹. Briefly, 1×10^6 cells were seeded in 12.5 cm² culture flasks (#sc-200257, UltraCruz, Biotechnology, CA, USA,) adjusting to a final volume of 4 ml with Leibovitz's L-15 medium (ATCC #30-2008) supplemented with 5% fetal bovine serum. The flasks were placed in an orbital incubator at 37 °C with constant agitation at 54 rpm for six days, renewing the medium at 24 h and then every 48 h. The size of the MTS was determined by collecting a sample at two, four, six and eight days of culture. They were then fixed with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). Following this, the two orthogonal diameters of 30 MTS were measured daily, using an inverted AXIO Scope A1 and Axiovision version 4.8.2.0 software (Carl Zeiss, Jena, Germany) microscope. The mean geometric diameter was determined based on the formula D_G where $D_G = \sqrt{a \times b}$ ⁴⁹. Individual assay was performed in triplicate.

Histology of MTS. Fixed MTS were embedded in paraffin and sectioned (5 µm). For the characterization of the MTS, the sections were processed and evaluated using different techniques. Staining was performed using 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or Mayer's hematoxylin (H&E) to visualize nuclei or the general structure of the MTS. Parallel incubation with primary antibodies diluted in bovine serum albumin was conducted using a 1:200 dilution for anti-Ki67 and 1:100 for anti-p27Kip1 and anti-HIF 1-α. Antibody binding was then visualized using the standard avidin-biotin-peroxidase complex technique (#K0690 LSAB™ + Kits, Universal Dako, Sao Paulo, Brazil) counterstained with Mayer's hematoxylin. The antibodies used were, Anti-HIF 1-α (Hypoxia-inducible factor-1, AB3883 Upstate Millipore), anti-p27Kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, ab54563 abcam) and anti-Ki67 (marker of proliferation Ki-67, AB9260 Millipore Chemicon, Jaffrey, USA).

Migration assays. Cells grown as a monolayer and 6 days MTS were disaggregated with Accumax (Chemicon, MA, USA. #SCR006) were seeded and subjected to real-time migration monitoring using the CIM-Plate 16 and xCELLigence System using a RTCA DP Instrument (ACEA Biosciences, Inc, San Diego CA, 92121 USA). In this system, 40 000 cells of each culture condition were seeded in the upper chamber of a CIM-Plate 16 without FBS. The upper chamber was then placed on the lower chamber of the CIM-Plate 16 containing growth medium supplemented with 10% FBS as an attractant, medium without FBS (negative control). Cell migration was monitored over a period of 24 to 30 hours. MDA-MB-231 cells were used as a positive control (Fig. S1). Three assays were performed for each culture condition. Statistical analysis was performed using *t*-tests.

Cell cycle analysis. Monolayer cells and MTS after six days of culture were dispersed using Accumax (#SCR006 Chemicon) in EMEM medium with 5% fetal bovine serum and filtered through a 70 µm mesh (# 352350, Falcon Corning, Tewksbury, MA, USA). The cell cycle was determined by flow cytometry using the DNA Reagent Kit (Cycletest Plus #340242, BD, Billerica, MA) following the manufacturer's recommendations. The samples were processed in a BD FACSAria Cell Sorter 3 and analyzed using the ModFit LT 3.2 version software. Each individual assay was performed in triplicate. Statistical comparisons were performed using *t*-tests.

Purification of total RNA from MCF-7 cells. Total RNA was isolated from monolayer and MTS cells cultured for six days using the PARIS Kit (#AM1921, Applied Biosystems, Woburn, MA, USA) following the manufacturer's recommendations, and excluding RNA less than 200 bp. RNA concentration and quality was determined by a combination of spectrophotometry (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA), and automated capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) using the Agilent RNA 6000 Nano. RIN values obtained were higher than 9.0 in all cases. Ribosomal RNA was removed by means of RiboMinus Eukaryote Kit (#A1083708, Invitrogen, Oregon, USA,) following manufacturer's instructions. Effective ribosomal RNA removal was corroborated using capillary electrophoresis.

RNA transcriptome. We constructed libraries with RNA isolated from MTS and monolayer cells at six days in culture using TruSeq RNA sample preparation (RS-122-2001, Illumina, San Diego, CA, USA) following the recommendations of the manufacturer, quantified by fluorometry (Qubit fluorometer, Invitrogen) and sequenced in a GAIIX machine (Illumina). We performed 2×72 bp runs. We obtained a total of 30,467,063 reads for the monolayer cultures and 24,363,843 reads for MTS cultures. After cleaning the reads, the RNA-Seq data were analyzed using the CLC genomics workbench (version 7 CLC Bio Cambridge, MA). The following parameters were used: alignment with 2 maximum number of mismatches; a 0.9 minimum length fraction; a 0.8 minimum similarity fraction; and 10 maximum hits for a read. Mapped reads range was $16 \times 10^6 - 28 \times 10^6$. All transcripts with a relative expression level lower than 0.2 and less than 10 reads were filtered out. Empirical analysis of differential gene expression was calculated using EdgeR algorithm⁵⁰.

qPCR validation of lncRNAs. We randomly selected three up-regulated and four down-regulated lncRNAs with >2.0-fold change for validation. In addition, 8 mRNAs associated to mitochondria or cell cycle were

arbitrarily selected and 4 lncRNAs/mRNAs co-regulated to additional validation. The nucleotide sequence of each lncRNA was obtained from LNCipedia 3.0 (<http://www.lncipedia.org/>) and the following specific primers for PCR were designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) (see Table S1) cDNA was synthesized from 2 µg total RNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (#K1642 Thermo Scientific) and a temperature of 65 °C, as recommended for RNAs that have a large amount of secondary structure. A semi-quantitative PCR was first performed to standardize the amplification and to provide enough DNA for subsequent steps. The correct amplification for all the amplicons was then verified using Sanger capillary Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. Then, qPCR was performed using the SYBR Select Master Mix Maxima (#4472908 Applied Biosystems). Analysis was carried out using a 7500 Real-Time PCR Systems and the sequence detector 1.4 version software (Applied Biosystems). The expression level of each lncRNA was represented as relative expression, using relative standard curve methods. For mRNAs, the relative gene expression was calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method. Differential expression between monolayers and MTS were analyzed using ANOVA for lncRNAs and *t*-tests for paired data for mRNAs. Six replicates were performed in each condition for lncRNA and three independent assays for mRNAs. A value of $p < 0.05$ was considered significant. We used *TBP* (TATA Box Binding Protein) as an endogenous control, because it is regulated less than GAPDH under different cellular conditions and exhibits low expression in MCF-7 cells⁵¹.

Oxygen consumption and determination of OxPhos flux. To determine oxygen consumption, MCF-7 monolayer culture (80% confluence) cells or MTS cells from 6 days of culture were disrupted with 3 ml of accutase (#00-45555-56, eBioscience) for 5 minutes at 37 °C. Cells were collected, gently washed with fresh medium and centrifuged at 1,200 rpm for 5 minutes at 37 °C. Then, the cells were suspended in 200–300 µL of Krebs-Ringer medium (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 1.4 mM CaCl₂, pH = 7.2). Rates of oxygen consumption were measured in a Strathkelvin Instruments 782 Oxygen Meter (North Lanarkshire, Scotland, UK) interfaced with a computer. Samples were placed in a water-jacketed chamber at 37 °C. Basal respiration rates were obtained by adding 1×10^6 of either MCF-7 monolayer or MTS cells from 6 days of culture to 200 µL of air-saturated Krebs-Ringer medium. 5 µM oligomycin or 6 µM carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) were added to determine oxidative phosphorylation (OxPhos) flux and full mitochondrial uncoupled respiration, respectively. In addition, 1 mM NaCN was added to fully inhibit mitochondrial oxygen consumption. Five assays were performed with each culture condition. Statistical analysis was performed using *t*-tests.

Overexpression of lncRNAs. DNAs from lnc-MYC-2:5, lnc-GAPDH-2:1, lncHIST1H2AG-2:1 and lnc-ANKRD30A-4:1 were cloned in the pQCXIP vector. Their sequences were synthesized as gBlocks (Integrated DNA technologies, IA, USA), designed to share 15 bp of homology at their ends with the vector digested with the restriction enzyme EcoRI (New England Biolabs, MA, USA. R101S). Ligation of the vector-gblocks was carried out using the In-Fusion HD Cloning Plus CE kit (Clontech, CA, USA. 638916). The plasmids were transfected into MCF-7 cells using the Transfection reagent X-Fect kit (Clontech, CA, USA. 631317) according to manufacturer's recommendations. Briefly, one day prior to transfection MCF7 cells were seeded at approximately 70% confluence in 6-well plates. Cells were transfected with 5 µg of each vector and 1.5 µL of the X-Fect Transfection Reagent. Forty-eight hours post-transfection, the RNA was extracted to evaluate the levels of each transcript.

References

- Dufau, I. *et al.* Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC Cancer* **12**, 15 (2012).
- Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* **33**, 1837–1843 (2015).
- Francia, G., Man, S., Teicher, B., Grasso, L. & Kerbel, R. S. Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents. *Mol Cell Biol* **24**, 6837–6849 (2004).
- Zhou, Y. *et al.* Multiparameter analyses of three-dimensionally cultured tumor spheroids based on respiratory activity and comprehensive gene expression profiles. *Anal Biochem* **439**, 187–193 (2013).
- Mellor, L. F., Baker, T. L., Brown, R. J., Catlin, L. W. & Oxford, J. T. Optimal 3D culture of primary articular chondrocytes for use in the rotating wall vessel bioreactor. *Aviat Space Environ Med* **85**, 798–804 (2014).
- Ivascu, A. & Kubbies, M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol* **31**, 1403–1413 (2007).
- Rinn, J. & Guttman, M. RNA Function. RNA and dynamic nuclear organization. *Science* **345**, 1240–1241 (2014).
- Merger, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* **10**, 155–159 (2009).
- Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* **81**, 145–166 (2012).
- Uva, P. *et al.* Rat mir-155 generated from the lncRNA Bic is 'hidden' in the alternate genomic assembly and reveals the existence of novel mammalian miRNAs and clusters. *RNA* **19**, 365–379 (2013).
- Necsulea, A. *et al.* The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature* **505**, 635–640 (2014).
- Autuoro, J. M., Pirnie, S. P. & Carmichael, G. G. Long noncoding RNAs in imprinting and X chromosome inactivation. *Biomolecules* **4**, 76–100 (2014).
- Takebayashi, H., Yamamoto, N., Umino, A. & Nishikawa, T. Identification of developmentally regulated PCP-responsive non-coding RNA, prt6, in the rat thalamus. *PLoS One* **9**, e97955 (2014).
- Huo, J. S. & Zambidis, E. T. Pivots of pluripotency: the roles of non-coding RNA in regulating embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 2385–2394 (2013).
- Yao, B. & Jin, P. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. *Genes Dev* **28**, 1253–1271 (2014).
- Uchida, S. & Dimmeler, S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res* **116**, 737–750 (2015).
- Zhao, T. *et al.* Identification of cancer-related lncRNAs through integrating genome, regulome and transcriptome features. *Mol Biosyst* **11**, 126–136 (2015).
- Rathmell, J. C. *et al.* Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* **23**, 7315–7328 (2003).
- Derrien, T. & Guigo, R. [Long non-coding RNAs with enhancer-like function in human cells]. *Med Sci (Paris)* **27**, 359–361 (2011).

20. Mimori, K. *et al.* Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **22**, 59–67 (2005).
21. Polyak, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**, 9–22 (1994).
22. Whitaker, H. C. *et al.* N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate peptidase-like 2 is overexpressed in cancer and promotes a pro-migratory and pro-metastatic phenotype. *Oncogene* **33**, 5274–5287 (2014).
23. Jiwa, L. S. *et al.* Upregulation of Claudin-4, CAIX and GLUT-1 in distant breast cancer metastases. *BMC Cancer* **14**, 864 (2014).
24. Aurilio, G. *et al.* A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* **50**, 277–289 (2014).
25. Gama, A. & Schmitt, F. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int* **2012**, 357187 (2012).
26. Abd-Elazeem, M. A. & Abd-Elazeem, M. A. Claudin 4 expression in triple-negative breast cancer: correlation with androgen receptors and Ki-67 expression. *Ann Diagn Pathol* **19**, 37–42 (2015).
27. van der Gun, B. T. *et al.* EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* **31**, 1913–1921 (2010).
28. Spizzo, G. *et al.* High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **86**, 207–213 (2004).
29. Nguyen-Ngoc, K. V. *et al.* 3D culture assays of murine mammary branching morphogenesis and epithelial invasion. *Methods Mol Biol* **1189**, 135–162 (2015).
30. Malavaki, C. J. *et al.* Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells. *FEBS J* **280**, 2477–2489 (2013).
31. Xu, X. D. *et al.* Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol Res Treat* **38**, 117–122 (2015).
32. Martinez, O. *et al.* Direct validation of aptamers as powerful tools to image solid tumor. *Nucleic Acid Ther* **24**, 217–225 (2014).
33. Sotgia, F. *et al.* Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol* **7**, 423–467 (2012).
34. Whitaker-Menezes, D. *et al.* Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* **10**, 1772–1783 (2011).
35. Neiman, J. A. *et al.* Photopatterning of hydrogel scaffolds coupled to filter materials using stereolithography for perfused 3D culture of hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* **112**, 777–787 (2015).
36. Rodriguez-Enriquez, S. *et al.* Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol* **216**, 189–197 (2008).
37. Cabili, M. N. *et al.* Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biol* **16**, 20 (2015).
38. Sirover, M. A. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *J Cell Biochem* **113**, 2193–2200 (2012).
39. Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. & Sawa, A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* **23**, 317–323 (2011).
40. Liang, S., Figtree, G., Aiqun, M. & Ping, Z. GAPDH-knockdown reduce rotenone-induced H9C2 cells death via autophagy and anti-oxidative stress pathway. *Toxicol Lett* **234**, 162–171 (2015).
41. Susumu Kageyama, E. H., Hiromi, I., Keiji, T. & Tatsuhiro Yoshiki, a. A. K. Gamma-Glutamylcyclotransferase: A Novel Target Molecule for Cancer Diagnosis and Treatment. *BioMed Research International* **2015**, 1–5 (2015).
42. Henson, A. L. *et al.* Mitochondrial function is impaired in yeast and human cellular models of Shwachman Diamond syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 29–34 (2013).
43. Toyoda, Y. *et al.* Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biol Open* **3**, 777–784 (2014).
44. Feng, Q., Crochet, J. R., Dai, Q., Leppert, P. C. & Price, T. M. Expression of a mitochondrial progesterone receptor (PR-M) in leiomyomata and association with increased mitochondrial membrane potential. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, E390–399 (2014).
45. Neve, E. P. *et al.* Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J Biol Chem* **287**, 6307–6317 (2012).
46. Jia, Z. *et al.* Identification of new hub genes associated with bladder carcinoma via bioinformatics analysis. *Tumori* **101**, 117–122 (2015).
47. Li, C. C. *et al.* GTP-binding-defective ARL4D alters mitochondrial morphology and membrane potential. *PLoS One* **7**, e43552 (2012).
48. Kintner, D. B. *et al.* Role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport and Na⁺/Ca²⁺ exchange in mitochondrial dysfunction in astrocytes following *in vitro* ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1113–1122 (2007).
49. Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. & Nielsen, L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* **83**, 173–180 (2003).
50. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
51. Tricarico, C. *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**, 293–300 (2002).

Acknowledgements

Pacheco-Marin Rosario was supported by a fellowship from CONACYT (CVU 225990), and this study is part of her doctoral thesis from the posgrade in Biologicas Sciences Doctorate Program, Faculty of Medicine, UNAM. Thanks to the training and support during her PhD. Julio Perez Carreon (Institute of Genomic Medicine) and Alejandro López Saavedra (Nacional Cancer Institute of Mexico) to facilitate the use of microscopes and photographs of MTS, Alfredo Mendoza Vargas and his staff for RNA sequencing and Valeria Jurado Quintanar for histological preparation of MTS (High Technology Units, National Institute of Genomic Medicine, Mexico) and Jose Luis Cruz Colin for their support in cell culture (National Institute of Genomic Medicine, Mexico).

Author Contributions

R.P. Study conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript: Critical revision. J.M. Study conception and design, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript: Critical revision. G.C. Critical revision, qPCR gene expression analysis, Analysis and interpretation of data. E.M. Critical revision, mitochondrial function assays, qPCR gene expression analysis, Analysis and interpretation of data. A.G. Critical revision, gain function tests. S.U. Critical revision, mitochondrial function assays, Analysis and interpretation of data. A.C. Critical revision, mitochondrial function assays, Analysis and interpretation of data. C.G. Critical revision, qPCR gene expression analysis. J.G. Critical revision, qPCR gene expression analysis. I.M. Critical

revision, analysis of cell migration. Analysis and interpretation of data. V.M. Study conception and design, Analysis and interpretation of data Drafting of manuscript: All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Pacheco-Marín, R. *et al.* Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Sci. Rep.* **6**, 23373; doi: 10.1038/srep23373 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>