



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO EN MODELO 3D EN
CO-CULTIVO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA
(MDA-MB-231) Y FIBROBLASTOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

IRAIS VILCHIS MERCADO

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ



**FACULTAD DE
CIENCIAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Vilchis

Mercado

Irais

5583688162

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

30933378-4

2. Datos del tutor

Dr.

Juan Carlos

Gallardo

Pérez

3. Datos de sinodal 1

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos de sinodal 2

Dra.

Silvia Cecilia

Pacheco

Velázquez

5. Datos de sinodal 3

Dra.

Fabiola

Hernández

Vázquez

6. Datos de sinodal 4

Dra.

Graciela Elena

Carrillo

Martínez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización proteómica del metabolismo energético en modelo 3d en co-cultivo de células de cáncer de mama (mda-mb-231) y fibroblastos

65 p.

2018

Dedicada a:

Martha Mercado García

Por enseñarme a tener sueños y no rendirme nunca.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias.

Al CONACYT por los recursos asignados a los proyectos: 243249 (Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez) y 239930 (Dr. Rafael Moreno Sánchez, jefe del Departamento de Bioquímica) en Ciencia Básica; y al proyecto No. 281428 de Infraestructura al Dr. Rafael Moreno Sánchez.

A la Beca CONACYT Ayudante de SNI Nivel III del Dr. Rafael Moreno Sánchez con número de Expediente 4479.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, especialmente a la Dra. Sara Rodríguez y al Dr. Rafael Moreno por incentivar un pensamiento crítico y contribuir en mi desarrollo profesional, académico y personal.

Al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez por la dirección del proyecto de investigación y por su guía en mi desarrollo académico, por transmitirme su pasión por la ciencia.

A mis sinodales por los comentarios y observaciones realizadas en esta tesis que mejoraron significativamente el escrito final.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi Madre Martha Mercado García por su fortaleza, su alegría, por ser excepcional. Por el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de mi vida, por todas las enseñanzas de vida, el amor y dedicación, por enseñarme a no rendirme jamás y a concluir mis proyectos.

A mi hermana Martha Alejandra por su Alegría, su entusiasmo, por todo el apoyo, cariño, por acompañarme en este camino, por querer ser bióloga también,

A mis abuelos Ángel Mercado Mondragón y Reina García Romero, por enseñarme qué es la perseverancia y mi primer acercamiento con el estudio de la vida, por su gran e incondicional amor por su apoyo, por todos los momentos juntos gracias.

A José G. Ventura, Martha M Hernández y Alhelí Adán que han estado conmigo toda una vida compartiendo risas, lágrimas y regaños. Apoyándome hasta el final en cada momento.

A Iván Montaña Jaramillo por su valioso apoyo en este gran proceso, por todo el ánimo, los consejos, los regaños, el infinito amor y tiempo conmigo, por complementar este ser lleno de caos con un poco de paz

A mi tutor Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, gracias infinitamente por todo el apoyo incondicional y la paciencia. Por enseñarme que es la ciencia en realidad dependiendo del espacio geográfico, por compartir sus conocimientos conmigo y a no dejarme rendir para seguir adelante, por ayudarme a crecer en todos los aspectos.

A mi gurú de la Bioquímica Dra. Silvia, por mostrarme la pasión con la que se debe hacer ciencia, por la paciencia y por transmitir tus conocimientos, por las críticas en mi proyecto por todo esto y mucho más Gracias.

A la mejor persona que pude conocer en la carrera Dra. Josefina Herrera, que no tengo palabras para agradecer cuanto me hizo crecer, desde el momento en que la conocí. Agradezco el tiempo brindado, los consejos y la ayuda, por enseñarme las habilidades que poseo.

A Todos los investigadores de Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por transmitir sus conocimientos, por la paciencia, por todos los buenos momentos Gracias.

A mis grandes amigos de la Facultad y de grupo de tumores: Ricardo, Erika, yohaly, Jimena, Mauricio, Mariel, Yuno, Valeria, Ossiel, Yael, Joss, Baruc Josua y a la factoría escénica especialmente a Marco Santiago por toda la paciencia, ya que son como mi segunda familia, gracias infinitamente por cada momento.

A Kaila, Granizo⁺ y Tiguer⁺ que me llenaron de alegría durante este proceso.

Por último, pero no menos importante a todas las personas que no están mencionadas, pero fueron parte importante en este proceso.

ABREVIATURAS

2OGDH: 2-oxoglutarato deshidrogenasa

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

ATP: Trifosfato de adenosina

ATPS: ATP sintasa

ANT: Transportador de adenín nucleótidos

CaMa: Cáncer de mama

CAF: Fibroblasto asociado a cáncer

CAV-1: Caveolina-1

COX-IV: Citocromo oxidasa complejo IV

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ECM: Por sus siglas en inglés Extracellular matrix (matriz extracelular)

HER-2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico de humano tipo 2

LDH-A, LDH-B: Lactato deshidrogenasa isoforma A y B

HIF-1 α : Factor transcripcional inducido por hipoxia

HKI: Hexocinasa I

HKII: Hexocinasa II

HPI: Hexosa Fosfato Isomerasa

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GLUT-1, GLUT-3: Transportador de glucosa isoforma 1 y 3

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama triple negativo

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón

MCT-1, MCT-4: Transportador de monocarboxilatos isoforma 1 y 4

MTS: por sus siglas en inglés: Multicellular Tumor Spheroid

NADH: Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina

ND1: Subunidad 1 del complejo 1 de la cadena respiratoria

NF-KB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PBS: Buffer fosfato salino

RE: Receptor de estrógeno

PDH: Complejo piruvato deshidrogenasa

PFK-1: Fosfofructocinasa isoforma 1

PPAR- γ : por sus siglas en ingles Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RIPA: Buffer de lisis (Radio inmunoprecipitacion Assay)

PKM: Piruvato cinasa Muscular

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

ROS: Especies reactivas de oxigeno

SDH: Succinato deshidrogenasa

SDS: Dodecilsulfato sódico

WB: Western Blot

INDICE

Resumen.....	1
1. Introducción	3
1.1 Cáncer	3
1.2 Cáncer de mama	4
1.3 Epidemiología de cáncer de mama en México	6
1.4 Cáncer de mama triple negativo	7
1.5 Microambiente tumoral.....	8
1.6 Fibroblastos normales.....	10
1.7 Fibroblastos asociados a cáncer (CAF) y cáncer de mama.....	10
1.8 Metabolismo energético de CAF	14
1.9 Modelos tridimensionales (3D) y co-cultivos	16
1.10 Metabolismo energético en modelos de co-cultivo 3D tumoral.....	19
2. Justificación	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivo General	22
4.1. Objetivos particulares	22
5. Metodología	23
5.1. Cultivo en monocapa	23
5.2. Cultivo primario de MEFs	23
5.3 Cultivo de esferoides tumorales	24
5.4. Análisis de proteínas por Western blot (WB).....	24
5.5. Análisis estadístico.....	25
6. Resultados.....	26
6.1 Curva de crecimiento de esferoides en co-cultivo	26
6.2 Contenido de proteínas del metabolismo energético	28
7. Discusión	33

7.1 Caracterización de modelo de esferoides en co-cultivo	33
7.2 Proteínas del metabolismo glucolítico	34
7.3 Proteínas del metabolismo mitocondrial.....	36
7.4 Factores de transcripción	36
7.5 Metabolismo energético en co-cultivos	38
8. Conclusiones	40
9. Referencias.....	41
10. Glosario	50
11. Anexo 1.....	51

Resumen

El cáncer de mama es una enfermedad que ha tomado importancia clínica en los últimos años a nivel mundial, por la alta incidencia que presenta y la mortalidad que causa entre las mujeres. A pesar de que las células tumorales son las causantes de esta malignidad, no son las únicas responsables de la progresión de la enfermedad. El microambiente tumoral, compuesto por fibroblastos, células del sistema inmune, miofibroblastos, leucocitos, células epiteliales, entre otras, juega un papel importante en el desarrollo y progresión del tumor al brindar factores de crecimiento y nutrientes. En el microambiente del cáncer de mama (CaMa), los fibroblastos asociados a tumor (CAF; por sus siglas en inglés), son el tipo celular más abundante y se ha sugerido que secretan metabolitos energéticos (lactato, piruvato y cuerpos cetónicos) que son aprovechados por las células tumorales para generar ATP. Sin embargo, no se han hecho análisis integrales (proteínas y flujos) del metabolismo glucolítico y mitocondrial, en tumores asociados con CAFs. Esta interacción puede simularse en modelos de co-cultivos de esferoides (modelo tridimensional, 3D), en donde podemos tener la relación CAFs-células tumorales. Este proyecto se enfoca en establecer un modelo en co-cultivo 3D de la línea celular de CaMa metastática: MDA-MB-231 con fibroblastos (MEFs) para analizar las modificaciones en el contenido de proteínas del metabolismo energético y factores de transcripción asociados a este, en comparación con un modelo 3D en monocultivo (esferoide de MDA-MB-231). Diferentes combinaciones (tumor: fibroblastos) se utilizaron para la generación de esferoides tumorales. De 8 combinaciones analizadas las relaciones 3:1 y 6:1 (tumor: fibroblasto) presentaron mayor crecimiento en comparación con la condición de monocultivo (diámetro del

esferoide al día 10 de cultivo: $665 \pm 40 \mu\text{m}$ para la relación 6:1 vs. $563 \pm 43 \mu\text{m}$ para la relación 3:1), en comparación con el control donde se obtuvo un diámetro de $287 \pm 41 \mu\text{m}$. Con la condición óptima de crecimiento (6:1) se analizó el contenido de proteínas del metabolismo energético. Los resultados indicaron un incremento (1-8 veces) en la expresión de proteínas glucolíticas: GLUT1, HKII, HPI, LDH-A y los transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT4; mientras que LDH-B, PFK, PKM mostraron una disminución del 40-60%. Por otra parte, no se observó una diferencia significativa en el contenido de proteínas mitocondriales COXIV, ND1, ATPs y ANT. Analizando los factores transcripcionales involucrados en la regulación del metabolismo energético se registró un aumento de 6 veces en HIF-1 α (factor transcripcional inducido por hipoxia que regula proteínas glucolíticas); mientras que PPAR- γ (factor transcripcional que regula funciones mitocondriales) no mostró cambios significativos. Lo anterior indica que el modelo en co-cultivo favorece el aumento de proteínas glucolíticas en la interacción células CaMa y fibroblastos. Lo anterior permitirá establecer, a futuro la implementación de metodologías para medir los flujos energéticos y determinar una posible estrategia terapéutica.

1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades más antiguas que se tienen datadas en la historia de la humanidad, registrándose un caso de cáncer de mama en el Papiro de Edwin Smith escrito alrededor de 3,000 A.C. [Hajdu, 2011]. A pesar de su antigüedad y de la gran inversión alrededor del mundo para encontrar una cura, aún no se han entendido completamente los mecanismos que promueven la progresión de la enfermedad y la respuesta de los pacientes a las diferentes terapias.

El cáncer se ha definido como una enfermedad de origen genético, heterogénea y multifactorial, que se caracteriza por 1) proliferación celular descontrolada e incrementada, 2) presentar un aumento en el crecimiento o volumen celular, 3) resistencia a la muerte celular (evasión de vías de apoptosis), 4) promoción de procesos inflamatorios, 5) inestabilidad genómica, 6) desregulación del metabolismo energético, 7) evasión el sistema inmune y 8) metástasis hacia sitios alejados del lugar de origen 9) Reprogramación del metabolismo energético 10) Angiogénesis formación de vasos sanguíneos [Hanahan y Weinberg, 2011]. Lo anterior favorece la progresión, la malignidad y la muerte de los pacientes.

1.2 *Cáncer de mama*

El cáncer de mama (CaMa) ha tomado relevancia en los últimos años debido a que se encuentra en el segundo lugar de cáncer con mayor presencia a nivel mundial; mostrando la mayor incidencia a nivel global y se ha observado un incremento en los casos que afectan a miles de mujeres en todo el mundo y en México [GLOBOCAN,2012; NIH, 2007]. El diagnóstico de esta enfermedad en etapas tempranas puede favorecer que el tratamiento brinde una recuperación rápida, evitando la metástasis a otros órganos. Sin embargo, la falta de herramientas para un diagnóstico oportuno reduce la eficacia de los tratamientos [Yao et al., 2017; Arce-Salinas et al., 2012].

Existen varias clasificaciones y tratamientos para el cáncer de mama dependiendo de la composición histológica, el estadio y el inmunofenotipo que presentan (Tabla 1); Dado que, en países en vías de desarrollo, el diagnóstico temprano es poco probable, el tratamiento sistemático primario empleado es aquel donde se busca reducir las clonas tumorales resistentes, evitar la metástasis y reducir el tamaño del tumor para que pueda ser retirado del paciente. Ya que, cada paciente tiene una progresión y tipo de cáncer distinta, así como respuesta a fármacos por lo que es poco probable predecir cuál será su respuesta [Arce-Salinas et al., 2012; Arce-Salinas et al.,2011; Cárdenas-Sánchez et al., 2009; NIH, 2007].

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama.

<p>Lugar de origen</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma ductal <i>in situ</i>: se caracteriza por presentar células epiteliales malignas dentro de los conductos mamarios, sin rebasar la membrana basal. Adopta diferentes patrones arquitectónicos (células en desorden) y de necrosis en diferente magnitud (se identifican por microscopía de luz). • Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS): presenta tejido tumoral en glándulas mamarias, es una lesión poco frecuente, su diagnóstico es a partir de un estudio histológico y diferencial con hiperplasia atípica. Es considerado como marcador de riesgo para el desarrollo de cáncer metastático.
<p>Subtipos de cáncer de mama</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Luminal A presenta positividad a receptor de estrógeno (RE), negatividad para factores de crecimiento epidérmico receptor humano 2 (HER2) y puede o no ser positivo para receptor de progesterona (RP). • Luminal B es positivo para RE, y puede presentar positividad para HER2 y RP • HER2 presenta, por inmunohistoquímica, una alta intensidad de señal en la proteína del factor de crecimiento tipo 2, positividad a HER-2 y negatividad para RE y RP. • Triple negativo: Presenta tinción negativa para: RE, RP y HER2.
<p>Clasificación TNM</p>	<ul style="list-style-type: none"> • T: tumor primario (tiene una escala de T_x-T₄, donde se describe la presencia o ausencia del tumor y el tamaño que presenta. • N: compromiso con ganglios linfáticos regionales (N_x-N₃ descripción de ausencia de tumor a ganglios comprometidos) • M: Metástasis a distancia (M_x: no evaluadas, M₀: sin metástasis demostrables, M₁: metástasis presentes).
<p>Estadios</p>	<p>Existen 4 estadios que describen el desarrollo del tumor.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estadio 0: hay células anormales presentes, pero no se han diseminado al tejido cercano. • Estadio I-III: hay células tumorales presentes, el tamaño del tumor puede variar y puede abarcar tejido adyacente. • Estadio IV: Presenta metástasis.

<p>Tratamientos usados en clínica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia neoadyuvante: se emplea en tumores de estadios avanzados y pueden ser operables, el objetivo de esta terapia es facilitar las modalidades quirúrgicas ya que identifica a pacientes que tienen una respuesta favorable con base en la expresión de receptores hormonales, proliferación celular (Ki67) y grado nuclear. esta terapia se emplea tratamiento sistémico con taxanos, antraciclinas e inhibidores de aromatasas (para uso de tumores hormonosensibles). • Terapia adyuvante: el objetivo de este tipo de terapias es prevenir la micrometastasis antes del desarrollo de clonas resistentes (las recurrencias son la primera causa de muerte en estos pacientes) se emplea una quimioterapia o terapia hormonal, estas pueden involucran ensayos con CMF (ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo), así como combinaciones con antraciclinas FAC (fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida) o FEC (fluorouracilo, epirubicina, ciclofosfamida). • Tratamiento paliativo: el objetivo de esta terapia es prevenir y disminuir los síntomas de la enfermedad (no busca una cura), para que los pacientes tengan una mejor calidad de vida.
--	--

Tabla modificada de la TNM (T, tamaño del tumor; N, lugar de inicio de tumor; M, existencia o no de la metástasis. RE= receptor de estrógeno, RP=receptor de progesterona, HER2=Factor de crecimiento epidérmico receptor humano tipo 2[Arce-Salinas et al.,2011; Singletary et al., 2002; Ceballo- Cancino et al.,2008; EBCTCG, 2005].

1.3 Epidemiología del cáncer de mama en México

En México, el CaMa ocupa el primer lugar en incidencia en neoplasias malignas en mujeres; según datos del INEGI, se estima que habrá 40 casos nuevos por cada 100,000 habitantes anualmente y se considera que cada año habrá un total de 23,000 casos nuevos [INEGI, 2017]. El INEGI también reportó un incremento en las defunciones por CaMa del 3.5% en los años 2010 al 2015. La población de mujeres que presentan con mayor frecuencia el CaMa se presenta con mayor frecuencia entre la edad de 45-50 años (mujeres premenopáusicas); algunos

factores de riesgo como: sobrepeso, obesidad, mala alimentación, exposición a hormonas, antecedentes familiares con cáncer de mama y sedentarismo [Lara-Medina et al.,2011; Cárdenas-Sánchez et al., 2015].

1.4 Cáncer de mama triple negativo

El subtipo triple negativo representa el 15% de los carcinomas mamarios y carece de un tratamiento determinado en la clínica [Lara-Medina et al., 2011]. Este subtipo se caracteriza por no presentar en su membrana los marcadores para el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2); su histología frecuente es ductal, de alto grado y con una alta tasa de proliferación [Lara-Medina et al., 2011]. Estudios han demostrado que el cáncer de mama triple negativo en mujeres hispanas se presenta con mayor frecuencia a la entre los 38-62 años, teniendo una mayor incidencia en mujeres premenopáusicas [Lara-Medina et al.,2011]. Este subtipo de cáncer presenta mayor agresividad y recurrencia en comparación con los otros subtipos de CaMa disminuyendo la sobrevida de las pacientes [Lara-Medina et al.,2011; Plasilova et al., 2016]. Uno de los principales problemas del tratamiento en este subtipo de cáncer es que al no contar con positividad a receptores hormonales (Tamoxifen) o aHER2 (Trastuzumab), las terapias adyuvante o neoadyuvante no son tratamientos específicos para estos pacientes. Por lo que, en la mayoría de las pacientes con enfermedad metastásica y subtipo triple negativo, la sobrevida en promedio es de 5 años a partir del diagnóstico [Yao et al., 2017; Anders et al.,2009]. Actualmente, la quimioterapia, individualmente o en

combinación (secuencial), es el tratamiento estándar para este subtipo de cáncer. De manera frecuente se emplea a agentes citotóxicos, como antraciclinas y taxanos, presentando altas tasas de recurrencia en los pacientes [Yao et al., 2017].

1.5 Microambiente tumoral

En los últimos años se ha establecido que el microambiente tumoral juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad ya que aporta factores para la progresión y supervivencia del tumor [Cirri y Chiarugi.2011]. El microambiente tumoral se compone de fibroblastos, células del sistema inmune, miofibroblastos, leucocitos y células mioepiteliales, que proveen de factores de crecimiento al tumor, permitiendo una interacción célula-célula de forma paracrina y formando una red de comunicación que favorece procesos como son la angiogénesis, metástasis, invasión y proliferación (Figura 1) [Cirri y Chiarugi, 2011; Hu y Polyak, 2008; Luo et al., 2015].

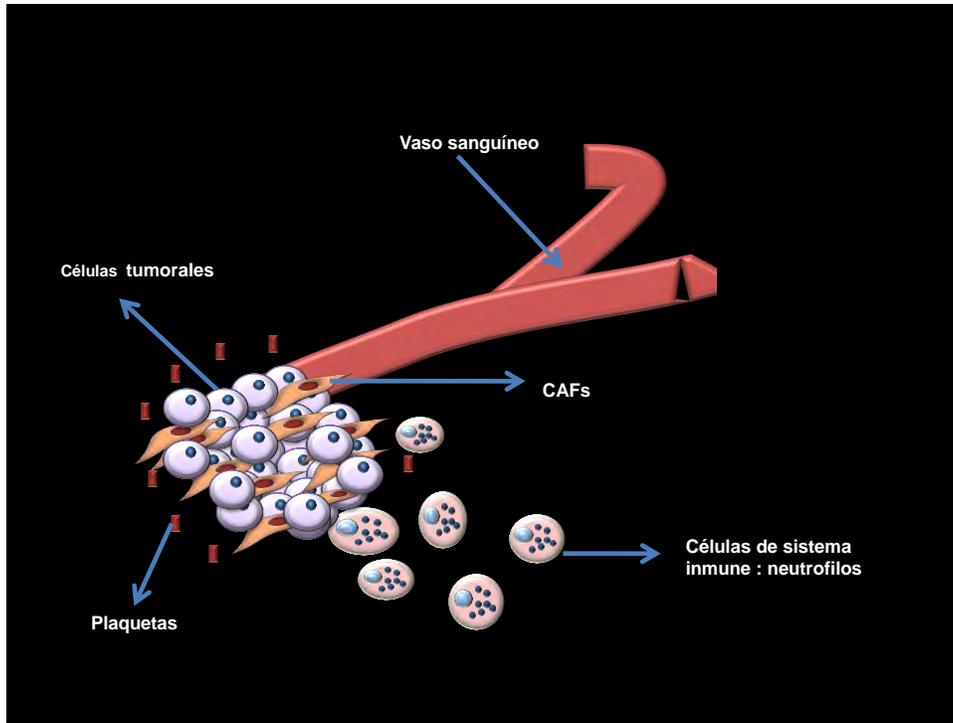


Figura 1. El microambiente tumoral se compone de células tumorales, vasos sanguíneos, plaquetas, células del sistema inmune y particularmente por CAFs (Fibroblastos asociados a cáncer por sus siglas en inglés).

El microambiente tumoral se encuentra presente en todas las etapas de esta enfermedad y existen dos vías de comunicación entre tumor y microambiente. La primera “vía eferente” donde las células tumorales desencadenan una respuesta reactiva en el estroma y las segunda “vía aferente” en donde las células más cercanas son modificadas por esta respuesta de las células tumorales. Este tipo de modificaciones en las células adyacentes ayudan al crecimiento y desarrollo del tumor favoreciendo la metástasis a otros órganos, así como la evasión del sistema inmune y procesos de regulación de la proliferación celular y modificaciones en su metabolismo [De Wever y Mareel, 2003].

1.6 Fibroblastos normales

Los fibroblastos son células muy importantes en el cuerpo humano siendo las más abundantes en el tejido conectivo. Son responsables de la secreción de componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés: Extracellular matrix). También mantiene la homeostasis tisular, participan en la regulación de procesos de inflamación y de diferenciación epitelial [De Veirman et al., 2014] y tienen un papel importante en la cicatrización o fibrosis ya que estos se activan para llevar a cabo la reparación del tejido. Posteriormente se someten a una muerte celular programada llamada nemosis (específica de fibroblastos), eliminándose por el tejido granular [Cirriy Chiarugi.2011; Räsänen y Vaheri et al., 2010].

1.7 Fibroblastos asociados a cáncer (CAF) y cáncer de mama

Los CAF al igual que los fibroblastos normales, son los encargados de mantener la estructura de la ECM y alimentar al tumor. Por lo que en los últimos años se han empleado en modelos de co-cultivo para el estudio de la interacción con células tumorales, uno de los modelos utilizados son los fibroblastos embrionarios de ratón, debido a que comparten características con los CAF, como es alta proliferación, secreción de factores de crecimiento, interleucinas y metabolitos energéticos (La Tabla 2 se muestran algunas características de fibroblastos normales, MEF y CAFs), esta línea se han utilizado como células alimentadoras

para varias líneas celulares, dando indicios de cómo se comportan en un sistema *in vivo* [Yusuf B et al.,2013; Zhao R et al.,2013].

Tabla 2. Características de fibroblastos normales y Fibroblastos asociados a cáncer (CAF)

<p style="text-align: center;">Fibroblastos normales</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de matrix extracelular • Procesos de reparación de la matriz extracelular • Expresión de alfa- actina y vimentina • Morfología de tipo estrella • Compuestos por fibronectinas y colágena fibrilar
<p style="text-align: center;">MEFs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tasa de proliferación alta • Secreción de factores de crecimiento (utilizados como células alimentadoras) • Pluripotenciales • Morfología tipo estrella • Secreción de fibronectinas y colágena •
<p style="text-align: center;">CAF</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación alta • Secreción de factores de crecimiento, como L- lactato, cuerpo cetónico y ácidos grasos • Presenta fenotipo miofibrásticos con una expresión de actina alfa (SMA) • Sobre expresión de TGF-β

La tabla describe características presentes en fibroblastos normales y fibroblastos asociados a cáncer, MEF = fibroblastos embrionarios de ratón. Son un ejemplo de los fibroblastos normales que se pueden utilizar para asociarlos células tumorales [De Veirman et al., 2014; Cirri et al., 2011; Mao et al., 2013; Yusuf B et al.,2013]

Los fibroblastos asociados a cáncer se denominan CAF (*por sus siglas en inglés: cancer-associated fibroblasts*) son más constantes en número dentro del microambiente tumoral y se considera las células más importantes dentro del estroma tumoral, los cuales están presente de manera abundante para CaMa, cáncer de próstata y cáncer de páncreas. Por ejemplo, la proporción de CAF en cáncer de mama representa hasta el 80% de todo el estroma tumoral [Giannoni et al., 2010]. Se ha reportado que los CAF participan en el crecimiento del tumor generando factores de crecimiento para la proliferación y crecimiento del tumor, también son los responsables de regular los procesos de reclutamiento de otras células; estudios han demostrado que los CAFs están involucrados en procesos de metástasis, invasión y angiogénesis [Cirri y Chiarugi. 2011]. Cuando un fibroblasto se asocia al tumor, no se eliminan por procesos de muerte programada y el proceso no es reversible. Su papel es multifacético ya que pueden reprimir el crecimiento del tumor y posteriormente promover el crecimiento y progresión del mismo, el cual puede ser más agresivo para el paciente [Cirri y Chiarugi, 2011; Luo et al., 2015]. Uno de los principales procesos que los CAFs llevan a cabo es aumentar la expresión de alfa actina de músculo liso (α -SMA) y de la fibronectina que es muy similares cuando ocurre una herida, estas señales son utilizadas por el tumor para poder asociar fibroblastos normales al estroma tumoral. La activación de CAFs esta mediada principalmente por TGF- β y CXCL12/SDF como los principales activadores; también están involucrados otros mecanismos como la participación de factores de crecimiento (b-FGF), interleucinas y la regulación a la baja de genes supresores de tumor como p53, p21, PTEN y CAV-1 los cuales

reprimen los efectos procarcinogénicos de los fibroblastos del estroma tumoral [Cirri y Chiarugi.2011; Mao et al., 2013]. Lo anterior confiere resistencia al tumor, mermando el efecto de las terapias convencionales de la clínica no son efectivas [Luo et al., 2015]. La identificación de CAF actualmente no es específica pero se lleva a cabo por marcadores moleculares como: a) α -SMA(participa en la reconstrucción de EMC, en condiciones normales participa en la reparación de heridas, en el estroma tumoral se asocia con un pronóstico precario); b) proteína específica de fibroblastos (FSP); c) factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, cuya principal función es el control de crecimiento de células mesenquimales; en cáncer se asocia a resistencia a fármacos y una sobrevida menor por parte de los pacientes); d) proteína de activación de fibroblastos (FAP, la cual es una proteína de membrana integral de tipo II *N*- glucosilada pertenece a la familia de serina proteasas unidas a la membrana plasmática, se propone que el aumento de FAP es un factor de un buen pronóstico en el avance del cáncer); e) p53; f) podoplanina (glucoproteína asociada al aumento del tamaño de tumor y procesos de metástasis); g) CD10, metaloproteinasas de matriz (MMP); h) tenascina-C (es una glicoproteína extracelular asociada a metástasis y disminución a la supervivencia del paciente); i) factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α/β); y j) disminución de caveolina-1 (Cav-1, es el principal componente de la membrana como proteína de andamiaje, así como transporte de lípidos, regulación de genes, transducción de señales y tráfico de membrana) [Luo et al., 2015;Buchsbaum et al., 2016]. En tumores se propone que la pérdida de

Cav-1 representa un grado avanzado de la enfermedad [Luo et al., 2015; Buchsbaum et al., 2016].

1.8 Metabolismo energético en CAFs

Se ha propuesto que la interacción de fibroblastos y células tumorales modifican el metabolismo del microambiente tumoral y los factores principales que participan son TGF- β , PDGF- α/β , factor de crecimiento de fibroblasto básico (b-FGF), la pérdida de cav-1 y la participación de interleucinas principalmente las 6 (IL-6) y 8 (IL-8) [Martinez-Outschoorn et al., 2010]. Estos componentes forman un ambiente redox por la liberación de especies reactivas de oxígeno en exceso (principalmente peróxido de hidrógeno), provocando una pérdida de Cav-1, y la estabilización del factor inducido por hipoxia (HIF-1 α) y NF κ B, los cuales promueven la activación de lisosomas y autofagia/ mitofagia en los fibroblastos, por lo que se ha propuesto que esta interacción induce un cambio hacia el metabolismo aeróbico (aumento en la glucólisis) en los CAFs [Martinez-Outschoorn et al., 2010; Luo et al., 2015] teniendo como resultado un aumento en la producción de lactato, piruvato y cuerpos cetónicos (3-hidroxiacetato) de 2-7 veces con respecto a las células tumorales. Estos sustratos se incorporan a las células tumorales a través de los transportadores de monocarboxilatos (por sus siglas en inglés MCT Monocarboxylate transporter. Los cuales se encuentran en aumento en su expresión). Por lo que se ha propuesto que se generan metabolitos para el ciclo de Krebs (a este proceso se le ha denominado efecto Warburg a la inversa), producción de aminoácidos, de NADH y precursores de membrana

(Figura 2) [Lisanti et al.,2010; Whitaker-Menezes et al.,2011; Lunt et al.,2011]. Todo lo anterior se ha sugerido, pero no se ha medido sistemáticamente (ni proteínas ni flujos de las vías energéticas) y solo se le da la importancia a la parte glucolítica, por lo que se propone que los CAFs son los encargados de suministrar sustratos para que las células tumorales generen ATP para el ciclo de Krebs y metabolitos que aportan sustratos para esta vía. Nuevamente estas propuestas no han sido evaluadas en modelos de co-cultivos tumor-fibroblastos.

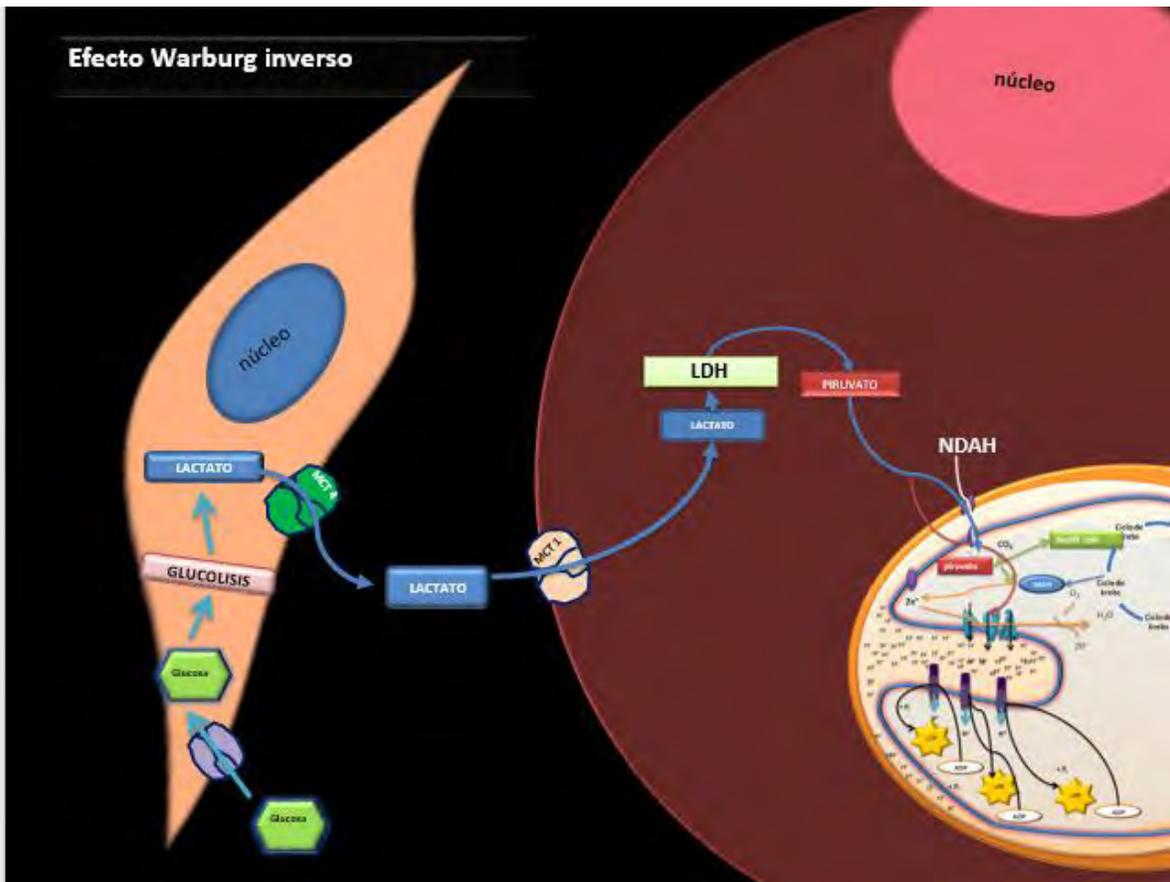


Figura 2. Efecto Warburg a la inversa en la célula tumoral y CAFs. Figura modificada de Bonuccelli G et al., 2011, en donde se puede observar el intercambio de metabolitos, como es el transporte de lactato por medio de los transportadores de monocarboxilatos entre CAFs y células tumorales.

1.9 Modelos tridimensionales (3D) y co-cultivos

Los modelos 3D permiten una simulación *in vitro* de las interacciones que se llevan a cabo entre las células, simulando los gradientes fisiopatológicos del tumor y que son relevantes para el desarrollo de futuras terapias. También, con este tipo de estrategias lo que se busca son modelos de alto rendimiento y más económicos, donde se puedan evaluar distintos fármacos que puedan ser prometedores antes de pasar a modelos preclínicos [Hirschhaeuser et al.,2010]. Existen varios modelos tridimensionales, pero esta tesis emplea esferoides multicelulares tumorales (MTS por sus siglas en inglés: Multicellular Tumor Spheroid), para generarlos se coloca una capa antiadherente, que puede ser matrigel, agarosa, geles de colágeno como soporte para su crecimiento en cultivo para la formación de estos [Gallardo-Pérez et al., 2006; Gallardo-Pérez et al., 2009; Mueller-Klieser, 1997]. Debido a que permite la formación de esferoides de diferentes líneas celular y la formación de un núcleo primario a partir del cual el esferoide crece. Durante la formación de un esferoide, las células se van uniendo de manera muy estrecha, posteriormente secretan matriz extracelular (ECM) por lo que se puede simular un ambiente *in vivo* y la composición de un tejido ya que presenta redes de comunicación, endosomas y producción de E-cadherina. Este tipo de modelos ha tomado importancia en los últimos años en estudios de cáncer, para analizar procesos de invasión, metástasis y angiogénesis ya que se pueden simular micro-tumores en estadios primarios [Herrmann et al.,2014] y ver el comportamiento de las células cuando se aplican fármacos antineoplásicos. En los modelos 2D, todas las células están expuestas a la misma cantidad de nutrientes

mientras que en el modelo 3D cada célula está expuesta a diferentes gradientes de nutrientes, oxígeno y espacio [Herrmann et al.,2014; Hirschhaeuser et al.,2010].

Existen diferentes tipos de esferoides 1) MTS clonogénicos, los cuales provienen de una línea celular o explante de tejido; también se pueden cultivar con otras líneas celulares como son células epiteliales, fibroblastos, células del sistema inmune añadiendo más complejidad al sistema. El cultivo de MTS se realiza en una superficie antiadherente como agarosa, matrigel o colágena, en donde forman un núcleo primario, posteriormente se someten a una agitación orbital suave (alrededor de 50 rpm), esto ayuda a que las uniones e interacciones formadas se consoliden; 2) MTS agregados que a diferencia de los anteriores estos no forman un núcleo primario ya que están desde su inicio en constante agitación orbital para formar agregados y su tiempo de agregación es menor en comparación con el modelo clonogénico [Gallardo. Pérez et al., 2006; Mueller-Klieser, 1997]; 3) MTS en Co-cultivo, los cuales pueden ser MTS clonogénicos o MTS agregados, pero se caracterizan por tener dos tipos de líneas celulares, principalmente una tumoral y otra normal proveniente del microambiente tumoral o estroma [Revisado en: Gallardo-Pérez et al., 2006; Gallardo-Pérez JC et al., 2009]. Actualmente se han hecho esferoides de fibroblastos y células tumorales para observar procesos de metástasis y resistencia a drogas, un ejemplo de ello es el cáncer de próstata [Revisado en: Gallardo-Pérez et al., 2006] (Figura 3).

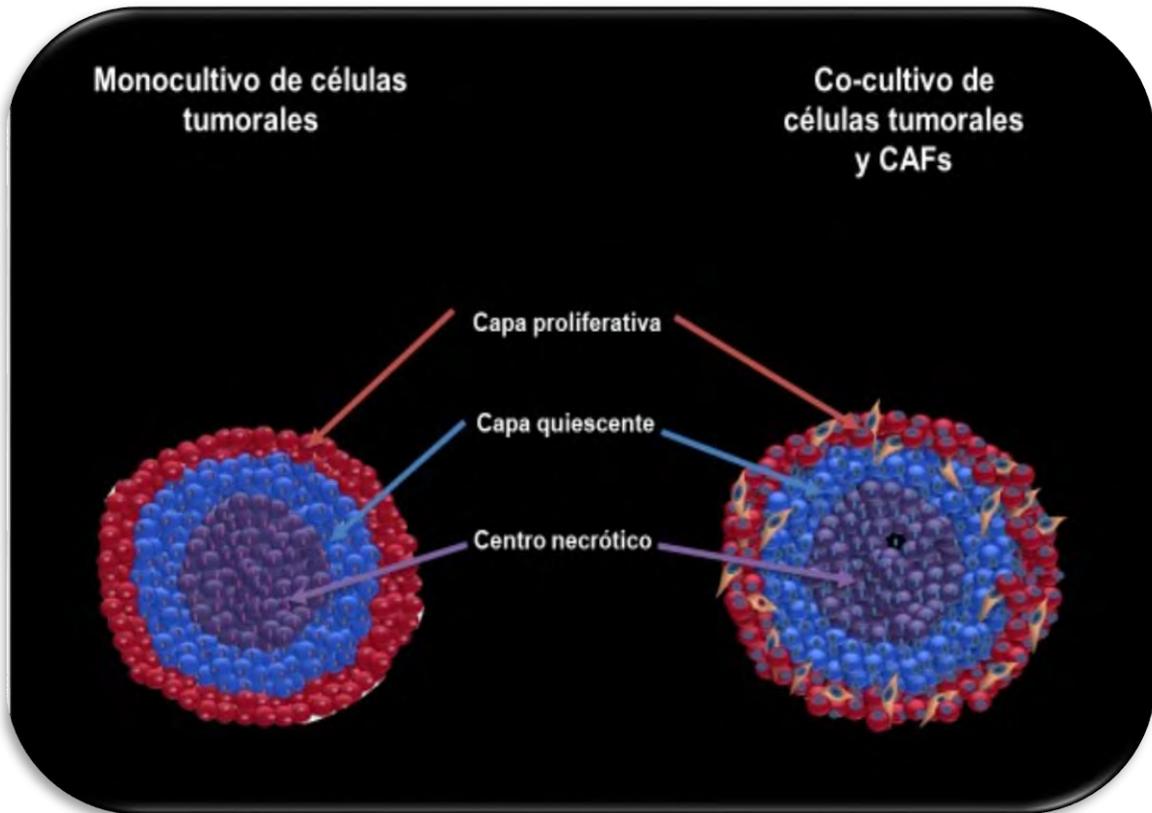


Figura 3. Modelo de esferoides tumorales en monocultivo (izquierda). El esferoide está formado por una línea celular tumoral en donde existen tres capas: la capa superficial, la cual es proliferativa, una intermedia que se encuentra en estado quiescente y una central en estado necrótico. El co-cultivo (derecha), es un esferoide formado por dos líneas celulares; en el caso de la imagen se ilustra un esferoide en co-cultivo de células tumorales y CAF (fibroblastos asociados a cáncer). En este modelo también se pueden formar las tres capas antes mencionadas. Imagen modificada de Mandujano-Tinoco et al. 2013.

1.10 Metabolismo energético en modelos de co-cultivo 3D tumoral

La energía que la célula necesita (ATP), para poder desarrollar todas sus funciones, tanto en células normales como en células tumorales, proviene únicamente de dos vías energéticas, la glucólisis y la fosforilación oxidativa.

En células tumorales se estableció en 1956 por Otto Warburg que la glucólisis está incrementada de 2-17 veces en comparación con las células normales aún en la presencia de oxígeno (efecto Warburg) [Warburg, 1956; Perderson, 1978; Moreno-Sánchez et al., 2007]; teniendo la hipótesis que la fosforilación oxidativa estaba dañada, aun cuando esta no fue evaluada. Por esta razón, uno de los sellos del cáncer es la modificación en el metabolismo energético principalmente porque existe una diferencia entre células normales y células tumorales, con respecto a una glucólisis. Lo anterior es cierto, pero no indica que la mitocondria sea disfuncional; de hecho, en muchas células tumorales como el cáncer de mama, la mitocondria aporta la mayor parte de la energía para la demanda de ATP celular [Moreno-Sánchez et al., 2007; Zu y Guppy, 2004]. Las células tumorales tienen aumentadas las vías metabólicas, implicando proteínas, transportadores y factores de transcripción involucrados como son GLUT-1, RAS, HIF-1 α Y HIF-2 α [Hanahan y Weinberg, 2011].

Reportes previos indicaron que en células de cáncer de mama en un modelo 3D (esferoides tumorales), el porcentaje de ATP de cada una de las vías en dos de las capas del esferoide (capas proliferativas y quiescentes), se encontró que el aporte energético de la fosforilación oxidativa fue de 93% para la capa proliferativas y 98% para la capa quiescentes del ATP, mientras que la glucólisis

aporta 7 y 2% respectivamente [Mandujano-Tinoco et al., 2013]. Lo que indica que la mitocondria no está dañada y es funcional aportando la mayor parte de ATP en el modelo. Lo anterior es importante ya que conociendo qué vía energética es la que aporta mayor cantidad de ATP se pueden dirigir estrategias, como posibles blancos terapéuticos anticancerosos. Ahora bien, este modelo 3D en el que se midió el aporte de ATP sólo estaba constituido de una línea celular tumoral. El tumor sólido *in vivo* consta de otras células importantes para su desarrollo (como los fibroblastos asociados a cáncer) las cuales se encuentran presentes en su microambiente tumoral.

Como se ha mencionado en esta tesis, la interacción microambiente-tumor modifica varios procesos y la desregulación metabólica es una de ellas. En el caso del metabolismo energético en modelos 3D de co-cultivos de células tumorales asociadas con CAFs no ha sido estudiado a detalle. Únicamente se han evaluado algunas proteínas o enzimas glucolíticas (piruvato cinasa, aldolasa, lactato deshidrogenasa), las cuales aumentaron 3-10 veces en co-cultivo (usando a MDA-MB-231/MEFS en una relación 6:1, tumor: fibroblasto) con respecto a su control en monocultivo (MDA-MB-231), infiriendo que los CAFs producen gran cantidad de lactato y piruvato (PKM2) a través de la glucólisis aerobia, los cuales son aprovechados por las células tumorales para la producción de ATP en el ciclo de Krebs [Bonuccelli et al., 2010]. Sin embargo, este tipo de teorías no se puede sustentar hasta que se haya hecho un análisis completo de todas las proteínas de metabolismo energético y flujos metabólicos [Moreno-Sánchez et al., 2016].

2. Justificación

El carcinoma mamario triple negativo, al carecer de un tratamiento adyuvante específico y dada su alta frecuencia en la población hispana éste se ha convertido en un tema de atención clínica. El análisis molecular de este subtipo sigue siendo un tópico de interés para la propuesta y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Entre éstas, el estudio del metabolismo energético tumoral emerge como una nueva área para la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Por otra parte, el desarrollo de co-cultivos en modelos tridimensionales (como son los esferoides) nos permite estudiar a los tumores en un contexto más fisiopatológico en comparación con los monocultivos en monocapa (ya que simulan condiciones iniciales en el crecimiento de un tumor). Este modelo, al mantener condiciones y variables controladas resulta atractivo, previo al desarrollo de estudios in vivo, para poder proponer nuevos blancos terapéuticos

3. Hipótesis

La interacción entre células tumorales y fibroblastos, generada en un modelo 3D del co-cultivo MDA-MB-231/MEF propiciará un aumento de proteínas del metabolismo energético en comparación con la condición en monocultivo.

4. Objetivo general

Determinar el contenido de proteínas del metabolismo energético en co-cultivo 3D de MDA-MB-231 y fibroblastos.

4.1 Objetivos particulares

- Establecer, en el modelo 3D de esferoide, la relación óptima entre células MDA-MB 231 y MEFs.
- Medir el contenido de proteínas por western blot de las siguientes proteínas del metabolismo energético:
 1. **Glucolisis:** GLUT-1, GLUT-3, HKI, HKII, HPI, PFK-1, GAPDH, PKM, LDH-A, LDH-B, MCT-1, MCT-4
 2. **Ciclo de Krebs:** 2OGDH, SDH, PDH
 3. **Sistema Oxidante: Cadena transportadora** ND1, COXIV
 4. **Sistema Fosforilante:** ATPS
 5. **Factores de transcripción:** HIF-1 α , c-Myc, PPAR- γ ,

5. Metodología

5.1 Cultivo en monocapa

Las células de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231 fueron cultivadas en cajas Petri (Corning®) de 100 x 20mm con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), 25 mM de glucosa a un pH de 7.2, adicionando 10,000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina enriquecido con 10% de suero fetal bovino. El cultivo se mantuvo en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 95% de O₂. Cuando se alcanzó una confluencia del 80% se tripsinizaron teniendo una exposición de 3-4 min de tripsina/EDTA (GIBCO) y se resembraron subsecuentemente. Al final, un total 2 dos resiembras fue requerido para el cultivo posterior de esferoides.

5.2 Cultivo primario de MEFs

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se sembraron en cajas de Petri (Corning®) de 100 x 20mm con gelatina de piel porcina (Sigma) al 0.01% en las mismas condiciones que MDA-MB-231. Al alcanzar una confluencia del 90% se tripsinizarón y se manejaron igual que en el apartado anterior.

5.3 Cultivo de esferoides tumorales

En cajas de Petri de 60 x 15mm con una capa delgada de agarosa al 2% se sembraron e incubaron en las condiciones previamente descritas un total de 100,000 células a las siguientes relaciones de células tumorales: MEFS:1:0, 0:1, 6:1, 1:6, 1:1, 3:1,10:1. Estas células se mantuvieron estáticas durante 5 días y posteriormente se pusieron en agitación constante (a 15 rpm). Se realizaron cambios de medio cada tercer día, durante 15 días. Se midió el diámetro de los esferoides formados con una reglilla graduada de 1 mm de diámetro, acoplada al ocular de un microscopio invertido Zeiss, observando bajo un objetivo de 10x.

5.4 Análisis de proteína por Western Blot (WB)

Para la cuantificación de proteínas por Western Blot se realizaron extractos celulares de los esferoides, los cuales se recolectaron de las cajas de Petri con agarosa y se centrifugaron a 3,200 rpm durante 3 min. Posteriormente se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) y a continuación el botón obtenido se disolvió con buffer RIPA (PBS 1X pH 7.2; 1% IGEPAL NP40; SDS 0.1% y desoxicolato de sodio 0.05% más una tableta de coctel de inhibidores de proteasa Roche, Mannheim, Alemania), con una jeringa de insulina se realizó fuerza mecánica para romper las células y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos. Al término se recuperó el sobrenadante, se cuantificó el contenido de proteína por el método de Lowry y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Para el análisis de WB se emplearon 40 µg de proteína resuspendida en buffer de carga (Glicerol 1mL, SDS 10%, Tris Cloro pH 6.8 1.25 mL y 5% de β-mercaptoetanol) y se cargaron en gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente las proteínas fueron transferidas electroforéticamente, a membranas de PVDF (BioRad, Hercules, CA) e incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: GLUT-1, GLUT-3, HKI, HKII, HPI,, PFK-1, GAPDH , PKM2, LDH-A, LDH-B, MCT-1, MCT-4, PDH, CS,2OGDH,SDH, ND1, COXIV, CS, ATP, HIF-1α, c-Myc, PPAR-γ, P53 (Santa Cruz; CA) a una dilución 1:1000 y se conjugaron con su anticuerpo secundario correspondiente (isotipo IgG de ratono de cabra) acoplados con peroxidasa de rábano a una dilución 1:2,000. La señal proteica fue detectada con el sistema ECL-plus de quimioluminiscencia en placas fotográficas (Amersham; Buckinghamshire IK) [Gallardo-Pérez et al., 2014].

El análisis densitométrico fue realizado con el software Scion Imagen (ScionCorp; Frederic, MD, USA), normalizando cada banda respecto al control de carga (α-tubulina) y asignándole a este un valor del 100%.

5.5 Análisis estadístico.

Los resultados se presentan en promedio ± desviación estándar. Cada uno de los experimentos realizados cuentan con un mínimo de 3 repeticiones independientes. Cada experimento está comparado estadísticamente con el control (monocultivo MDA-MB-231= relación 1:0) mediante la prueba de *t*-de Student y considerando como significativos los valores $P < 0.05$ y $P < 0.01$.

6. Resultados

6.1 Curva de crecimiento de esferoides en co-cultivo

Los resultados del crecimiento de los esferoides en co-cultivo de la línea celular MDA-MB-231 y MEFs se muestran en la Tabla 3. En esta Tabla se observa el diámetro alcanzado por los esferoides en las distintas relaciones experimentales que se evaluaron (tumor: MEFs), en donde las condiciones 6:1 y 3:1 fueron las que tuvieron un mejor crecimiento al día 10 de 665 ± 37 y 563 ± 43 μm de diámetro respectivamente (filas en tono azul oscuro) en comparación con su control (relación 1:0). Las otras relaciones no tuvieron un incremento significativo en el diámetro con respecto al control.

Tabla 3. Crecimiento esferoidal de co-cultivo MDA-MB-231 y MEFs.

Condición			Diámetro inicial (μm)	Diámetro final (μm)	Numero de esferoides contados
Células tumorales	Fibroblastos (MEFs)	% de la población total de MEFs	Día 0	Día 10	
0:1		100	87 \pm 24	160 \pm 9	100
1:6		86	95 \pm 4	150 \pm 3	150
1:3		75	76 \pm 26	207.5 \pm 48	40
1:1		50	85 \pm 4	160 \pm 9	150
3:1		25	75 \pm 24	563 \pm 43*	30
6:1		14	133 \pm 7	665 \pm 40 *	190
10:1		10	104 \pm 22	231 \pm 45	40
1:0		0	112 \pm 6	287 \pm 41	190

Diámetro inicial y final, así como porcentaje de población de fibroblastos en el esferoide de * $p \leq 0.05$ vs. 1:0 diámetro final (control MDA-MB-231). n= número de muestras

La relación 6:1 fue la elegida para los experimentos posteriores, la cual se representa gráficamente en la Figura 4 ya que se observó un mayor crecimiento en el diámetro final comparación con las condiciones en monocultivo relación 1:0 (control tumor) y 0:1(control fibroblastos).

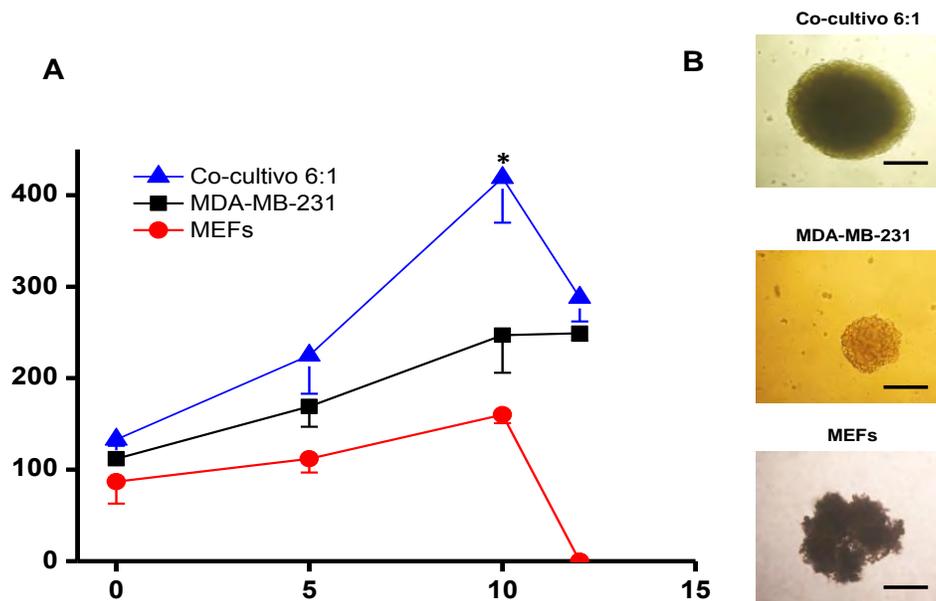


Figura 4. Curva de crecimiento de esferoides en monocultivo y co-cultivo. A la derecha se muestran fotos representativas de los esferoides al día 10 de cultivo. $n=40-80$; $*P \leq 0.01$ vs. MDA-MB-231. Barra= 100 μm .

6.2 Contenido de proteínas del metabolismo energético

a) Glucólisis

A continuación, se midió el contenido de proteínas para las condiciones control (relación 1:0) y para el co-cultivo (relación 6:1) por medio de western blot. En la Figura 5 se muestra el contenido de las proteínas glucolíticas, en donde se puede observar un aumento en las proteínas GLUT 1, GLUT3, HKI, HKII, HP1, LDH-A, MTC1, MTC4 aumentando en un rango de 0.2 a 7.8 veces respectivamente en

comparación con el control. También se encontró una disminución en las proteínas PFK-1, PKM2, LDH-B con un porcentaje del 6al 70%.

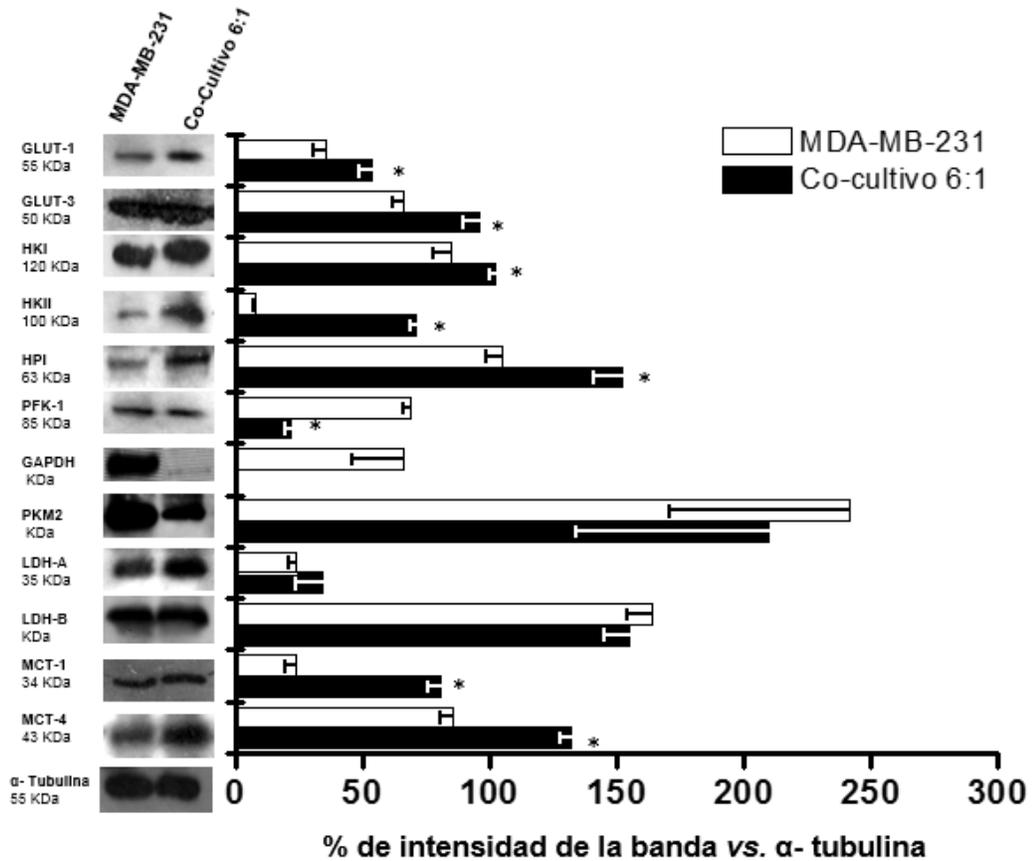


Figura 5. Contenido de proteínas glucolíticas en esferoides de MDA-MB-231 y co-cultivo 6:1. Las imágenes muestran las bandas representativas de cada proteína mientras que las barras de la derecha indican la densitometría, la cual está normalizada contra el control de carga α -tubulina. Abreviaturas. Glut 1 y 3, transportador de glucosa tipo 1 y 3; HKI, hexocinasa tipo I; HKII, hexocinasa tipo II; HPI, hexosa fosfato isomerasa; PFK-I, fosfofructocinasa tipo I, GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; PKM2, piruvato cinasa muscular tipo II; LDH-A, lactato deshidrogenasa tipo A; LDH-B, lactato deshidrogenasa tipo B; MCT1 y 4, trasportador de monocarboxilatos. n=3; *P \leq 0.05 vs. MDA-MB-231.

b) *Metabolismo Mitocondrial*

En la Figura 6 se muestran las proteínas mitocondriales evaluadas. En este grupo únicamente se observó aumento en la proteína PDH (5 veces) en el co-cultivo con respecto al control, mientras que las otras proteínas se mantienen con una expresión semejante con el control.

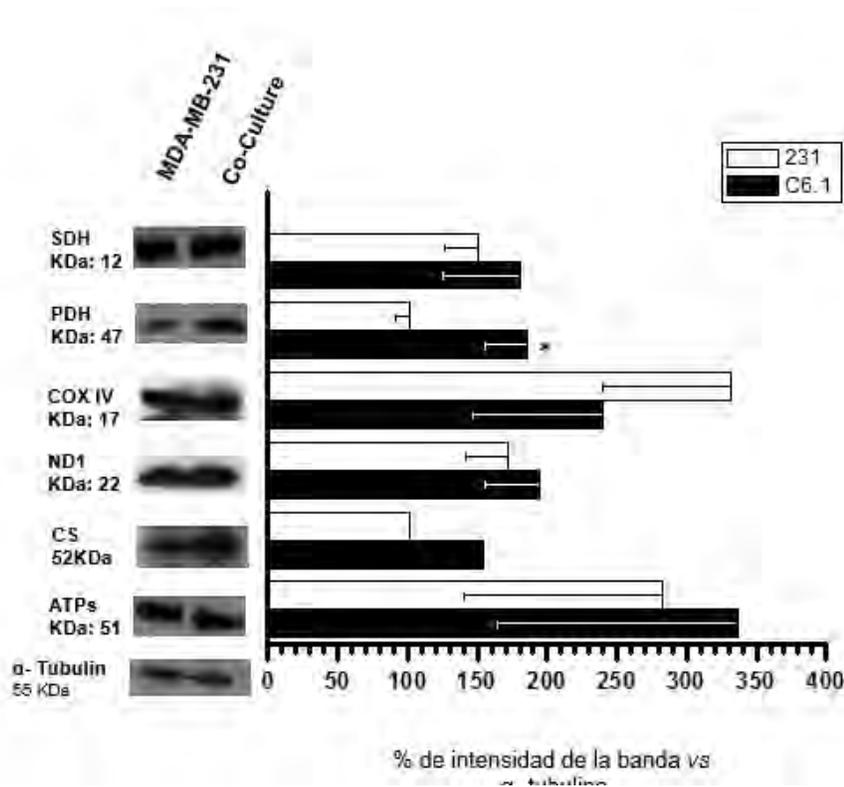


Figura 6. Contenido de proteínas mitocondriales en esferoide de MDA-MB.231 (barras blancas) y Co-cultivo 6:1 (barras negras). A la derecha se muestra el WB representativo de cada una de las proteínas y a la izquierda la densitometría, la cual está normalizada con el control de carga (α -tubulina). Abreviaturas: PDH, piruvato deshidrogenasa; 2OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa; COXIV, citocromo C oxidasa subunidad IV; ND1, NADH deshidrogenasa; ANT, translocador de adenilnucleotidos; ATPs, ATP sintasa. n=2-3; *P \leq 0.05 vs. MDA-MB-231.

c) Factores transcripcionales

En la Figura 7 se muestran los factores de transcripción relacionados con el metabolismo energético, en donde HIF-1 α es el único que muestra un incremento de 6 veces con respecto al control, mientras que C-Myc, PPAR- γ , no muestran ningún cambio.

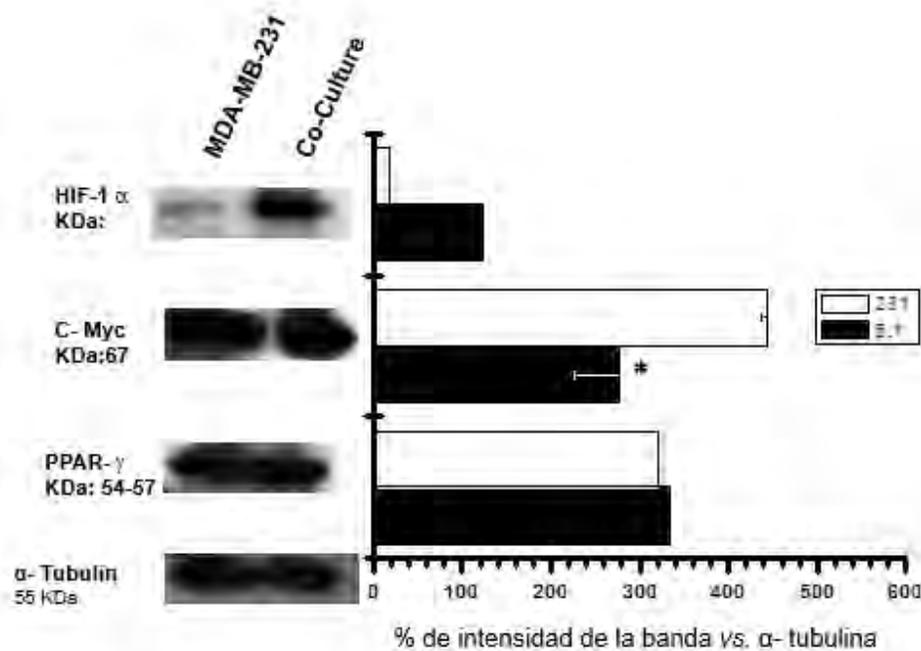


Figura 7. Contenido de proteínas de factores de transcripción y oncogenes en esferoide de MDA-MB-231 (barras blancas) y co-cultivo 6:1 (barras negras). A la derecha se muestra el WB representativo de cada una de las proteínas y a la izquierda la densitometría, la cual está normalizada con el control de carga (α -tubulina). Abreviaturas. HIF-1 α , factor inducible de hipoxia alfa; c- Myc, H-RAS; K-RAS; PPAR- α ; PPAR- γ ; TIGAR. n=2-3; *P \leq 0.05 vs. MDA-MB-231.

d) Medición de flujos metabólicos

A pesar de que el flujo metabólico no forma parte de los objetivos de esta tesis, se realizaron experimentos, tanto de la producción de lactato sensible a 2-desoxyglucosa (como función glucolítica) como de la respiración mitocondrial sensible a oligomicina (como función mitocondrial). La metodología de estas mediciones se indica en el **Anexo 1**. Los resultados preliminares mostraron que la producción de lactato en los esferoides en co-cultivo es mayor en comparación a los esferoides en monocultivo. El aumento del contenido de proteínas en las enzimas glucolíticas podría explicar la aumentada producción de lactato.

En el caso de la respiración mitocondrial los esferoides en co-cultivo tienen una menor respiración en comparación con el control, las proteínas no disminuyen entre ambas condiciones, por lo que no existe una está correlación proteína-función. Para ello es necesario realizar un mayor número de determinaciones para identificar los cambios significativos entre estas dos condiciones, así como medir el porcentaje de ATP que aporta cada una de estas vías.

7. Discusión

7.1 Caracterización de modelo de esferoides en co-cultivos

Los modelos 3D *in vitro* permiten tener un alto rendimiento, acercamiento inicial a los procesos pato-fisiológicos *in vivo*, antes de pasar a modelos más complejos (animales), permitiendo desarrollar nuevas estrategias terapéuticas [Herrmann et al.,2014; Hirschhaeuser et al.,2010]. diferentes investigadores han realizado un gran esfuerzo para desarrollar un modelo 3D de esferoide en co- cultivo, el cuales permita realizar estudios a largo plazo sobre procesos tumorales; para ello han evaluado varias combinaciones tumor/CAFs. En el estudio de Li, L y Lu, [2011], evaluaron 6 combinaciones tumor/MEFs (1:0, 6:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:6) entre las líneas 4T1 (tumor mamario de ratón) y MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón), en un modelo de esferoides obteniendo que el modelo tridimensional puede variar de tamaño dependiendo de la cantidad de células de cada una de las líneas. El efecto de un mayor crecimiento fue en la combinación 1:1. Al utilizar fibroblastos de ratón nos permite tener características similares a las que presentan los fibroblastos asociados a cáncer desde el inicio en el modelo, debido a que secretan factores de crecimiento, lactato, interleucinas y actina que permite una mejor formación de esferoides [Li y Lu, 2011; Mamidi MK et al.,2011; Bazzoli et al.,2012; Frese KK y Tuveson DA.,2007]. En este proyecto las diferentes combinaciones de MDA-MB-231 y MEFs, la mejor combinación es 6:1 permitiendo un mayor tamaño del esferoide (Tabla 3). Lo anterior es un resultado novedoso ya que muchos estudios no ocupan a la línea celular MDA-MB-231 debido a que, tiene una baja cantidad de E-cadherina, por lo que no puede formar esferoides

tumorales [Espinoza-Sánchez et al.,2017]. Sin embargo, con la combinación de MEFs, se logra la formación de estos, lo que nos puede dar indicios de cómo se comporta esta línea celular en sus primeros estadios.

La curva de crecimiento (Figura 4) nos muestra que la población de esferoides en los co-cultivos tiene un comportamiento heterogéneo, permitiendo obtener esferoides de diferente diámetro en cada una de las combinaciones. Las combinaciones de células tumorales con fibroblasto que nos permitió observar un cambio en el crecimiento en el tamaño del esferoide son 3:1, aumentando 2 veces) y 6:1 aumentando 2.5 veces respecto a diámetro final en comparación con el control (1:0). Se ha reportado que se ve un efecto como es el crecimiento y proliferación celular en los tumores cáncer de próstata a partir del 25% CAFs [De Veirman et al., 2014]. Sin embargo, en el modelo establecido en este proyecto la población total de fibroblastos que mostró mayor potencial en el crecimiento fue de 14% en la población de MEFs seguido del 25% (Tabla 3).

7.2 Proteínas del metabolismo glucolítico

En la condición 6:1 (tumor: fibroblastos) el contenido de proteínas glucolíticas (GLUT 1, GLUT3, HKI, HKII, HP), podemos ver un cambio significativo con respecto al control (relación 1:0) aumentando en un rango de 0.2-7.8 (Figura 5). Se ha reportado que GLUT 3, HKII, HPI son enzimas controladoras del flujo de la vía glucolítica en células tumorales [Marín-Hernández et al.,2011], lo que nos sugiere que la combinación de MDA-MB-231 con fibroblastos en esferoides de co-cultivo, al incrementar el contenido de estas enzimas tiene también un papel de

control en la vía. En el caso las enzimas PKM2 y LDH-A, se ha reportado en modelos 3D de xenoinjertos con las line celular MCF-7 un aumento de 7.7.y 4.2 veces respectivamente, ellos concluyen que este aumento tiene una modificación en la vía Glucolítica y que esta es la principal, dado por la secreción de lactato del tumor [Bonuccelli et al.,2010]. Pero, en el modelo tridimensional de esferoides en co-cultivo no se ve un cambio significativo en estas proteínas con respecto al control; también el modelo de co-cultivo no presenta un cambio en las proteínas de LDH-B y HKI. Hay que recordar que las proteínas medidas en este modelo son al día 10 y que posiblemente esta expresión de las enzimas cambie temporalmente en los primeros días.

En el modelo de esferoides en co-cultivo también se obtuvo una sobre expresión de los transportadores de monocarboxilatos (MTC) tanto de la isoforma 1 como de la 4, con un aumento de 3.5 y 1.5 veces respectivamente. Se han realizado estudios en cáncer de mama tanto en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 para los transportadores de monocarboxilatos en donde se ha atribuido que el transporte de cuerpos cetónicos entre las células se lleva a cabo por el MTC-1 que facilita la absorción de estos cuerpos cetónicos mientras que el MTC-4 es el responsable de la secreción de estos [Whitaker-Menezes et al., 2011]. Se ha reportado que los fibroblastos no expresan MTC-4 cuando se encuentran solos y MDA-MB-231 sí lo expresa, pero esta no es significativa [Whitaker-Menezes et al.,2011], por lo que tener una sobre expresión de estas proteínas nos podría indicar que sí hay un intercambio de cuerpos cetónicos y lactato en el modelo de

esferoide en co-cultivo, el aumento de lactato se puede ver observado en una mayor producción de lactato en el medio (Anexo 1).

7.3 Proteínas del metabolismo mitocondrial

El metabolismo mitocondrial ha tomado importancia en los últimos años debido a que varios investigadores han demostrado que la mitocondria si es funcional y no daña como anteriormente se había propuesto, en algunos tumores el metabolismo mitocondrial es que suministra mayor cantidad de ATP [Moreno-Sánchez et al 2016; Martinez-Outschoorn et al., 2016]. En el modelo de esferoide el contenido de proteínas mitocondriales presentó un cambio significativo en la enzima PDH, con un aumento de 5 veces, esto puede sugerir que el efecto Warburg a la inversa se está llevando a cabo. El lactato entra por los transportadores MCT y por la enzima PHD se convierte en a Acetil-coenzima para poder entrar al ciclo de Krebs [Bonuccelli et al., 2010]. Sin embargo, las otras enzimas de la vía no se ven modificadas con respecto al control, aun cuando se ha reportado para COX IV y la SDH disminuye su expresión cuando están asociados con fibroblastos estas proteínas en el modelo de co-cultivo no presentaron cambios significativos indicando que esta interacción no modifica el metabolismo mitocondrial.

7.4 Factores de transcripción

El factor de transcripción HIF-1 α juega un papel importante en la progresión del tumor. Se ha reportado para células tumorales como mediador de expresión de proteínas de enzimas glucolíticas (GLUT 1, GLUT3, HKI Y II, PFK-L, ALDOSA-A y

C, PGK1, ENO, alfa-PYK-M2, LDH-A y PFKFB-3) [Marín-Hernández et al.,2011]. En la Figura 7 se observa un incremento de 7 veces en HIF-1 α en co-cultivo con respecto al control, indicando que este factor de transcripción se encuentra estabilizado. El lactato y el piruvato pueden que este factor inducido por hipoxia sea constante [Marín-Hernández et al.,2009] ya que en el medio extracelular de los esferoides se encontró un aumento del lactato de 3 veces vs. el control (Anexo 1), lo que podría estabilizar a este factor y como consecuencia podemos ver un aumento en las enzimas glucolíticas, principalmente en las enzimas controladoras de la vía en tumores (GLUT 1 y 3 y HKII) (Figura 5) [Marín-Hernández et al., 2009]. Por otra parte, no se observó una diferencia significativa en PPAR- γ un factor transcripcional que está involucrado en la regulación de algunas funciones glucolíticas (síntesis de ácidos grasos, procesos de proliferación y ciclo celular) [Grommes et al., 2004]. Al no presentar un cambio significado la interacción entre células tumorales y fibroblastos en comparación con el control nos puede indicar que su papel no está tomando una gran relevancia en el co-cultivo, lo que si ocurre con HIF-1 α . El caso de c-Myc se describe como una fosfoproteína nuclear que participa en la proliferación, diferenciación tumoral [Park et al., 2001] y también tiene la función de ser un factor de transcripción importante para mantener la actividad mitocondrial, generando intermediarios para el ciclo de Krebs y biogénesis mitocondrial [Graves et al., 2012]. En el modelo de co-cultivo presenta una disminución con respecto al control y esta podría ser una de las explicaciones por las que las proteínas mitocondriales no presenten ningún cambio, ya que no hay un aumento en los metabolitos. Sin embargo, también se

reporta como un factor importante en la biogénesis mitocondrial y se propondría para un proyecto posterior medir la cantidad de mitocondrias por métodos de microscopia electrónica.

7.5 Metabolismo energético en co-cultivos

En el modelo de esferoides podemos ver que no hay un cambio significativo con respecto al control y éstas se mantienen, lo que nos sugiere que la mitocondria no tiene una modificación en su metabolismo al interactuar con los fibroblastos. No obstante, hay que considerar que las expresiones de proteínas no muestran una actividad real de las enzimas por lo que se necesita hacer actividades enzimáticas y flujos para ver el porcentaje de ATP que está aportando en cada vía [Moreno-Sánchez et al., 2016]. Medir una función de la glucólisis (la producción de lactato) y la respiración (consumo de oxígeno mitocondrial), nos permite conocer un poco más el metabolismo real de los esferoides en co-cultivos, este proyecto no contempla medir estos parámetros, pero un primer acercamiento de los primeros resultados se muestra en el anexo 1 en donde vemos que la respiración total del cultivo es 3 veces menor en comparación con la del control. El modelo de esferoide en co-cultivo nos muestra una mayor expresión en las proteínas glucolíticas (Figura 5) y una producción de lactato 3 veces mayor en comparación con el control (Anexo 1). Se ha propuesto que este metabolito se utiliza como sustrato para la fosforilación oxidativa [Chiavarina et al., 2011]. Sin embargo, una

cuestión de este trabajo es para qué necesita el tumor más lactato si él mismo ya produce más lactato que el tejido normal (Efecto Warburg). Parecería ser que el lactato que le genera el fibroblasto no sería importante; pero, es probable que en modelos tridimensionales parecidos a la realidad pato-fisiológicos de un tumor sólido, la glucólisis pudiera ser una vía principalmente utilizada por la célula tumoral para generar intermediarios para la síntesis de nucleótidos mediante la vía de las pentosas fosfato y la generación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [Chen et al.,2015]. De esta manera, el lactato generado por el fibroblasto y usado por el tumor puede ser utilizado como precursor de ácidos grasos para la síntesis de membranas [Menendez y Lupu, 2007]. Por lo tanto, este modelo se puede utilizar para el estudio de cada una de estas vías metabólicas.

8. Conclusiones

El modelo en co-cultivo de células tumorales MDA-MB-231 y fibroblasto en la relación 6:1 y 3:1 favorecen un incremento en el tamaño y estabilidad del modelo 3D (esferoide) en co-cultivo de cáncer de mama triple negativo, lo que permite un estudio de esta interacción en cáncer.

La relación 6:1 (células tumorales MDA-MB-231: fibroblastos) tienen un aumento en las proteínas controladoras relacionadas con la vía glucolítica, así como con los factores transcripcionales como HIF-1 α encargados de la transcripción de esas enzimas. Mediante el análisis de proteínas sugiere que la interacción tumor: fibroblastos, aumenta la glucólisis, convirtiéndola en la vía preferencial para la síntesis de ATP. A pesar de que el modelo de co-cultivo no modifica el contenido de proteínas mitocondriales nos dice que esta parte es funcional y se tiene que considerar para el futuro planteamiento de terapias alternativas que vayan dirigidas al metabolismo energético.

9. Referencias

Arce-Salinas C, Lara-Mediana FU, Alvaro-Miranda A, Castañeda-Soto N, Bargalló-Rocha E, Ramírez-ugalde Mt, Pérez-Sánchez V, Rivera L, Gambo-Vignole C, Santamaría-Galicia J, Nieves-Casas RI, Morán- Muñoz H, Mohar-Betancurt A. (2012). Evaluation of breast cancer treatment at a tertiary-level institution with Popular Health Insurance in Mexico, *México*. *Clinical Research Journal*: 64(1). 9-16

Bazzoli, E., Pulvirenti, T., Oberstadt, M. C., Perna, F., Wee, B., Schultz, N. Squatrito, M. (2012). MEF promotes stemness in the pathogenesis of gliomas. *Cell Stem Cell*, 11(6), 836-844

Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Witkiewicz AK, Vander Heiden MG, Migneco G, Chiavarina B, Frank PG, Capozza F, Flomenberg N, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. (2010) The reverse Warburg effect: glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle*. ;9(10):1960-1971.

Buchsbaum, R. J., & Oh, S. Y. (2016). Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers*, 8(2), 19.

Chen X, Qian Y, Wu S. (2015). The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radic Biol Med.*; 79:253-63

Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *American Journal of Cancer Research*, 1(4), 482–497.

Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Martínez-Outschoorn, UE, Witkiewicz, AK, Birbe, RC, Howell, A., Lisanti, MP (2011). La expresión de piruvato quinasa (PKM1 y PKM2) en fibroblastos asociados al cáncer impulsa la producción de nutrientes estromales y el crecimiento tumoral. *Cancer Biology & Therapy*, 12 (12), 1101-1113.

David Herrmann, James R.W. Conway, Claire Vennin, Astrid Magenau, William E. Hughes, Jennifer P. Morton, Paul Timpson (2014); Three-dimensional cancer models mimic cell–matrix interactions in the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 35 (8): 1671-1679.

De Veirman, K., Rao, L., De Bruyne, E., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., Vanderkerken, K. (2014). Fibroblastos asociados al cáncer y crecimiento tumoral: enfoque en el mieloma múltiple. *Cánceres*, 6 (3), 1363-1381.

De Wever O, Mareel M. (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 200(4):429-47.

Espinoza-Sánchez, N. A., Vadillo, E., Balandrán, J. C., Monroy-García, A., Pelayo, R., & Fuentes-Pananá, E. M. (2017). Evidence of lateral transmission of aggressive features between different types of breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 51(5), 1482–1496.

Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer*. 7(9):645-58.

Gallardo-Pérez JC, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodríguez-Enríquez S, Aviles A, Moreno-Sánchez R, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. (2009) NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids. *J Cell Biochem*. 1;108(1):169-80.

Gallardo Pérez JC, Espinosa Castilla M., Meléndez Zajgla J. y Maldonado Lagunas V. (2006); Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *reb* 25(4): 101-107.

Gallardo-Pérez JC, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S (2014). GPI/AMF inhibition blocks the development of the metastatic phenotype of mature multi-cellular tumor spheroids. *BiochimBiophys* ;1843(6):1043-53.

Graves, J. A., Wang, Y., Sims-Lucas, S., Cherok, E., Rothermund, K., Branca, M. F., Prochownik, E. V. (2012). Mitochondrial Structure, Function and Dynamics Are Temporally Controlled by c-Myc. *PLoS ONE*,7(5): e37699

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>] consultado 2017

Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004) . Antineoplastic effects of peroxisomeproliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 5(7):419-29

Hajdu, S. I. (2011), A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117: 1097–1102.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4;144(5):646-74

Herrmann D, Conway JR, Vennin C, Magenau A, Hughes WE, Morton JP, Timpson P (2014). Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment. *Carcinogenesis.*;35(8):1671-9.

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.*;148(1):3-15.

Hu, M., & Polyak, K. (2008). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*,44(18), 2760–2765.

INEGI. Estadísticas de mortalidad [en línea] consultado 2017 disponible en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est>

Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra-Pérez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., Villarreal-Garza, C., González-Angulo, A. M., Bargalló, E., Aguilar, J. L., Mohar, A. and Arrieta, Ó. (2011), Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. *Cancer*, 117: 3658–3669.

Li, L., & Lu, Y. (2011). Optimizing a 3D Culture System to Study the Interaction between Epithelial Breast Cancer and Its Surrounding Fibroblasts. *Journal of Cancer*, 2, 458–466.

Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Chiavarina B, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Tsirigos A, Witkiewicz A, Lin Z, Balliet R, Howell A, Sotgia F (2010). Understanding the "lethal" drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment. *Cancer Biol Ther*;10(6):537-42

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 441-64

Luo H, Tu G, Liu Z, Liu M. (2015) Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett*. 1;361(2):155-63.

Mamidi MK, Pal R, Mori NA, Arumugam G, Thrichelvam ST, Noor PJ, Abdullah HM, Gupta PK, Das AK, Zakaria Z, Bhonde R. (2011) Co-culture of mesenchymal-like stromal cells derived from human foreskin permits long term propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem*.;112(5):1353-63.

Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. (2013) Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys*;1833 (3):541-51.

Mao, Y., Keller, ET, Garfield, DH, Shen, K., y Wang, J. (2013). Células del estroma en el microambiente tumoral y el cáncer de mama. *Cancer Metastasis Reviews*, 32 (0), 303-315.

Mao, Y., Keller, ET, Garfield, DH, Shen, K., y Wang, J. (2013). Las células del estroma tumoral y en microambiente cáncer de mama. *La metástasis del cáncer Opiniones*, 32 (0), 303-315.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. (2011) Modeling cancer glycolysis. *BiochimBiophys*; 1807(6):755-67.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R (2009). HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem*. ;9(9):1084-101.

Martinez-Outschoorn, U. E., Balliet, R. M., Rivadeneira, D. B., Chiavarina, B., Pavlides, S., Wang, C. Isanti, M. P. (2010). Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell Cycle*,9(16), 3256–3276.

Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP (2014). Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.*;41(2):195-216

Menendez JA, Lupu R. (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.*7(10):763-77.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274(6): 1393-418.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S (2016). Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J.* 283(1):54-73.

Mueller-Klieser W (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol:* 273 (4 Pt 1):C1109-23.

Review. National Institutes of Health (US) (2007); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); Understanding Cancer.

National Institutes of Health (US) (2017). Breast Cancer Treatment (PDQ®)—Health [consultado en línea] disponible en https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/pro/tratamiento-seno-pdq#section/_919

Park DS, Razani B, Lasorella A, Schreiber-Agus N, Pestell RG, Iavarone A, Lisanti MP. (2001) Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry*. 20;40(11):3354-62.

edersen PL (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res*.22:190-274.

Plasilova, ML, Hayse, B., Killelea, BK, Horowitz, NR, Chagpar, AB, y Lannin, DR (2016). Características del cáncer de mama triple negativo: Análisis de 38.813 casos de la base de datos nacional de cáncer. *Medicine* ,95 (35): e4614

WARBURG O (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*.;124(3215):269-70

Weigelt, B., Ghajar, C. M., & Bissell, M. J. (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 0;69-70:42-51

Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K. Lisanti, M. P. (2011). Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*, 10(11), 1772–1783.

Yusuf B, Gopurappilly R, Dadheech N, Gupta S, Bhonde R, Pal R. (2013) Embryonic fibroblasts represent a connecting link between mesenchymal and embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*;55(3):330-40.

Zhao R, Xie X, Shen GX. (2013) Effects of glycated low-density lipoprotein on cell viability, proliferation, and growth factors of mouse embryo fibroblasts. *Can J Physiol Pharmacol.*;91(1):64-70.

Zu XL, Guppy M (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *BiochemBiophys Res Commun.*;16;313(3):459-65.

10. Glosario

Tumor primario

Tx: tumor primario, no se puede evaluar

T0: no hay evidencia de tumor primario

Tis: CDIS carcinoma ductal in situ

CLIS: carcinoma lobulillar in situ

T1: tumor con diámetro ≤ 20 mm

T1mi: tumor donde su diámetro mayor es ≤ 1 mm

T1a: tumor con un diámetro > 1 mm, pero ≤ 5 mm

T1b: tumor con un diámetro > 5 mm, pero ≤ 10 mm

T1c: tumor con un diámetro > 10 mm, pero ≤ 20 mm

T2: tumor que presenta un diámetro > 20 mm, pero ≤ 50 mm

T3: tumor > 50 mm en su diámetro mayor

T4: tumor que puede presentar cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o dermis esta puede ser ulceración o nódulos cutáneos

T4a: extensión a la pared torácica, no incluye solo la adherencia o invasión al musculo pectoral

T4b: ulceración y/o nódulos satélites y/o edema de la piel, que cumple criterios de carcinoma inflamatorio

T4c: características de T4a y T4b combinadas

T4d: carcinoma inflamatorio

GANGLIOS

Nx: no se puede hacer una evaluación de los ganglios regionales.

N0: no hay metástasis a ganglios periféricos

N1: presencia de metástasis a ganglios ipsilaterales, del nivel I o II de la axila

N2: metástasis en ganglios

11. ANEXO 1

MEDICION DE LACTATO EN EL MEDIO

El lactato en el medio se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340nm, acoplado el consumo de lactato con la generación de NADH, en la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Se utilizó el amortiguador Hidracina (0.4M) /glicina (0.5M) pH: 4.9, 1ml por celda, 20 µl de LDH (1:4, 10U), 10µl de NAD⁺ (Stok 100 mM) y 20µl de medio recolectado 24 horas antes tanto control (esferoides de MDA-MB-231), como de la condición6:1 (MDA-MB-231: MEFs). También se cuantificó el lactato que contiene el medio lo cual se le restó a la cuantificación experimental.

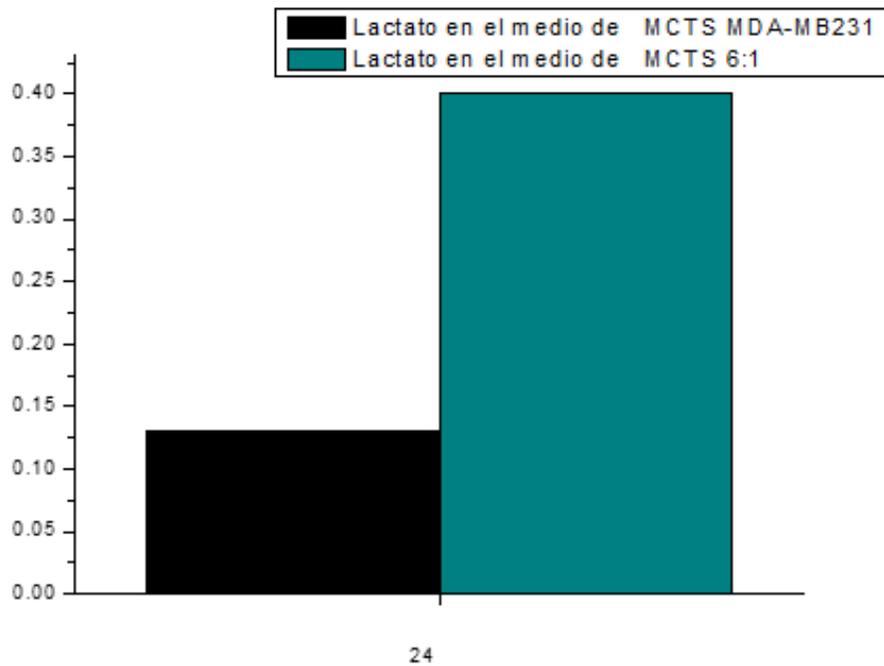


Figura 8. Producción de lactato en el medio cuantificado a las 24 horas. Se agrego medio de cultivo fresco en el día 9 y, al cumplir 24 horas, se recolectó y se cuantificaron en las unidades mM/mg/hrs (24 hrs) de lactato. Se observa una mayor producción en la condición 6:1 (barra azul derecha) en comparación con el control (barra negra, izquierda).

RESPIRACION MITOCONDRIAL

El consumo de oxígeno se midió utilizando el Oxygraph-2K (instrumento para respirometría de alta resolución). Se incubaron los esferoides MDA-MB-231 (relación 1:0, control) y MDA-MB-231: MEFs (relación 6:1, experimental) (1 mg de proteína / ml) a 37 ° C en un buffer Ringer Krebs(KR) saturado de aire bajo agitación constante a 400 rpm. El flujo de OxPhos se estimó mediante la adición de oligomicina a una concentración final de 5 μ M, el consumo de oxígeno no mitocondrial se estimó mediante la adición de KCN a una concentración final de 10 mM Finalmente, la concentración de oxígeno cero se determinó mediante la adición de un exceso de ditionita de sodio.

Tabla 4. Consumo de oxígeno en esferoides MDA-MB-231 y MDA-MB-231: MEFs

	Respiración total (ngAtO/min/mg)	OxPhos (ngAtO/min/mg)
MDA-MB-231 Esferoide	12\pm3	2\pm0.4
6:1 Esferoide	3.3	2

La tabla muestra el consumo total de oxígeno en ngAtO/min/mg y la fosforilación oxidativa (OxPhos) dado por MDA-MB-231 con un total de n=3 y el co-cultivo 6:1 (MDA-MB-231: MEFs) con n=1.

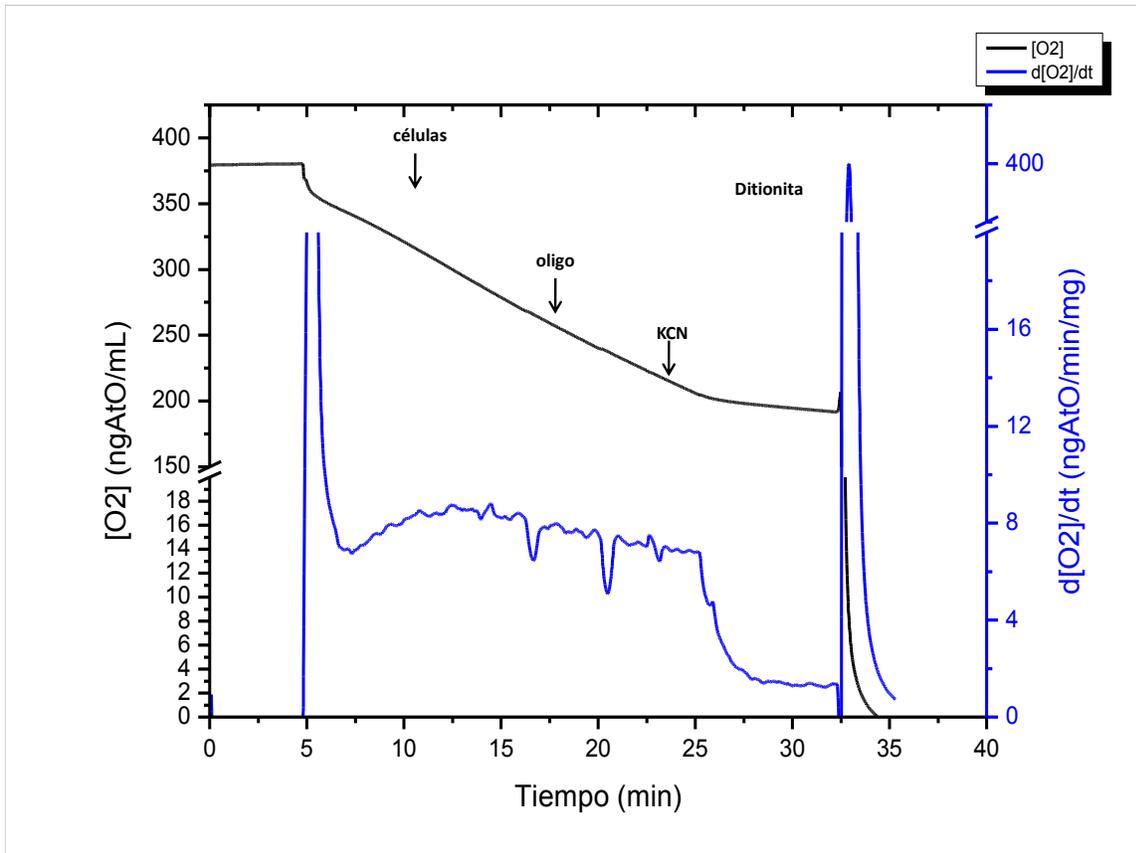


Figura 9. Trazo representativo de consumo de oxígeno por esferoides control (MDA-MB-231) en el equipo Oroboros.