



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

DESARROLLO DE MODELOS IN VITRO BASADOS EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES Y EN MONOCAPA PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA AL TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIESTROGÉNICOS Y QUIMIOTERAPÉUTICOS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
ANA LAURA CANCINO VILLEDA**



CDMX, MÉXICO.

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Sobeida Sánchez Nieto

VOCAL: Profesor: Euclides Avila Chávez

SECRETARIO: Profesor: Alfonso León Del Río

1er. SUPLENTE: Profesora: Tzventanka Dimitrova Dinkova

2do. SUPLENTE: Profesora: Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO B-046

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA,

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA:

DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

SUSTENTANTE (S):

ANA LAURA CANCINO VILLEDA

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
1. ANATOMÍA DE GLANDULA DE MAMA	3
2. CÁNCER DE MAMA	4
3. MECANISMOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR RECEPTORES NUCLEARES DE HORMONAS, RECEPTOR ESTRÓGENO	5
4. CORREGULADORES TRANSCRIPCIONALES	7
5. COMPUESTOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA	8
A) COADYUVANTES HORMONALES	8
B) AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS	10
I) PACLITAXEL	11
II) FLUOROURACILO	11
III) CISPLATINO	12
6. LÍNEA CELULAR MCF7 Y SOBREEXPRESANTE DE NHERF2	12
A) LÍNEA CELULAR MCF7	12
B) LÍNEA CELULAR MCF7/NHERF2	14
7. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA	14
CULTIVOS 2D Y 3D	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	16
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	45
CONTRIBUCIÓN	47
REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	3
FIGURA 2. MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES INDUCIDOS POR ESTRÓGENOS	6
FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE TAMOXIFENO.	9
FIGURA 4. EL PERFIL MOLECULAR Y LAS PROPIEDADES DE LA CÉLULA MCF7	13
FIGURA 5. CULTIVO 3D	15
FIGURA 6. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROYECTO	20
FIGURA 7. WESTERN BLOT	24
FIGURA 8. DENSIDAD CELULAR Y DIFERENCIACIÓN	25
FIGURA 9. GRÁFICAS DE VIABILIDAD A TRAVÉS DEL TIEMPO EN CULTIVOS 3D EN CÉLULAS MCF7 Y MCF7-NHERF2	26
FIGURA 10. CULTIVOS 3D EN PRESENCIA DE ESTRADIOL	28
FIGURA 11. VIABILIDAD EN PRESENCIA DE E2	29
FIGURA 12. CULTIVOS 3D EN PRESENCIA DE TAMOXIFENO	31
FIGURA 13. VIABILIDAD EN PRESENCIA DE TAMOXIFENO	33
FIGURA 14. CULTIVOS 3D EN PRESENCIA DE QUIMIOTERAPÉUTICOS	35
FIGURA 15. VIABILIDAD EN PRESENCIA DE PACLITAXEL, 5-FU Y CISPLATINO	37
FIGURA 16. GRÁFICA KAPLAN MEIER	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA	5
TABLA 2. MEDIDAS DE LOS ESFEROIDES ANTE LA PRESENCIA DE ESTRADIOL	29
TABLA 3. MEDIDAS DE LOS ESFEROIDES EN PRESENCIA DE TAMOXIFENO	32
TABLA 4. MEDIDAS DE LOS ESFEROIDES ANTE LA PRESENCIA DE QUIMIOTERAPÉUTICOS	36

RESUMEN

En el cáncer de mama, los tipos de cáncer luminal A y luminal B son receptor de estrógenos α (ER α) positivo. El ER α es un factor de transcripción nuclear dependiente de estrógenos cuya función es regular la expresión de genes involucrados en la división y la diferenciación celular, la apoptosis y la regulación del metabolismo celular. A su vez, la actividad del ER α es modulada por su interacción con diversos correguladores transcripcionales entre los que se encuentra la proteína NHERF2, cuya función como coactivador transcripcional fue caracterizada y publicada por Meneses Morales en el 2014.

En el laboratorio se encontró que los tumores de cáncer de mama que sobreexpresan a la proteína NHERF2 muestran un aumento en el potencial tumorigénico de células de cáncer de mama. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un sistema *in vitro* basado en la formación de esferoides celulares en cultivo 3D y compararlos con los cultivos en monocapa, a través de las células MCF7 (ER α positivo) y MCF7/NHERF2 para medir la viabilidad celular en presencia de estradiol, tamoxifeno y de diferentes quimioterapéuticos (paclitaxel, fluorouracilo y cisplatino).

Los resultados obtenidos demostraron que la viabilidad se ve afectada dependiendo del modelo experimental utilizado y la presencia de los tratamientos a lo largo del tiempo. En el caso de estradiol se observó que la viabilidad estuvo por arriba del 80 % en ambos modelos y en ambas líneas celulares; con tamoxifeno la viabilidad se vio mayormente afectada en las células MCF7 en el modelo 2D y en las células MCF7/NHERF2 se observó la resistencia a éste, pero con una disminución en la viabilidad modelo 2D. Finalmente para el caso de los quimioterapéuticos, el fluorouracilo fue el único fármaco que afectó la viabilidad en las sobreexpresantes de NHERF2, mientras que paclitaxel presentó una mayor viabilidad en los esferoides y cisplatino no se observó diferencia.

Los resultados nos sugieren la continuidad del uso de cultivos tridimensionales, ya que las similitudes en la expresión de genes, las condiciones fisiológicas y morfológicas son más convenientes para el desarrollo de terapias para el tratamiento de cáncer de mama.

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
Cis.	Cisplatino
E₂	Estradiol
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
HRE	Elementos de respuesta a hormonas
Pac.	Paclitaxel
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
TOT	Tamoxifeno
VEH.	Vehículo
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
5-FU	Fluorouracilo

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula sudorípara modificada que forma parte de la piel. Cada glándula mamaria está contenida dentro de un pecho redondeado cubierto de piel. Ligeramente por debajo del centro de cada pecho hay una zona pigmentada, la areola, que rodea una protuberancia central: el pezón (Marieb & Hoehn, 2008). A nivel interno, cada glándula mamaria consiste de 15-25 lóbulos secretorios, incrustados en tejido adiposo (Fig. 1) y cuyo desarrollo y diferenciación en la pubertad y embarazo dependen de la secreción de estrógenos ($17\text{-}\beta$ estradiol, E_2) y la actividad del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) (Paxton, Adele & Peckham, 2018).

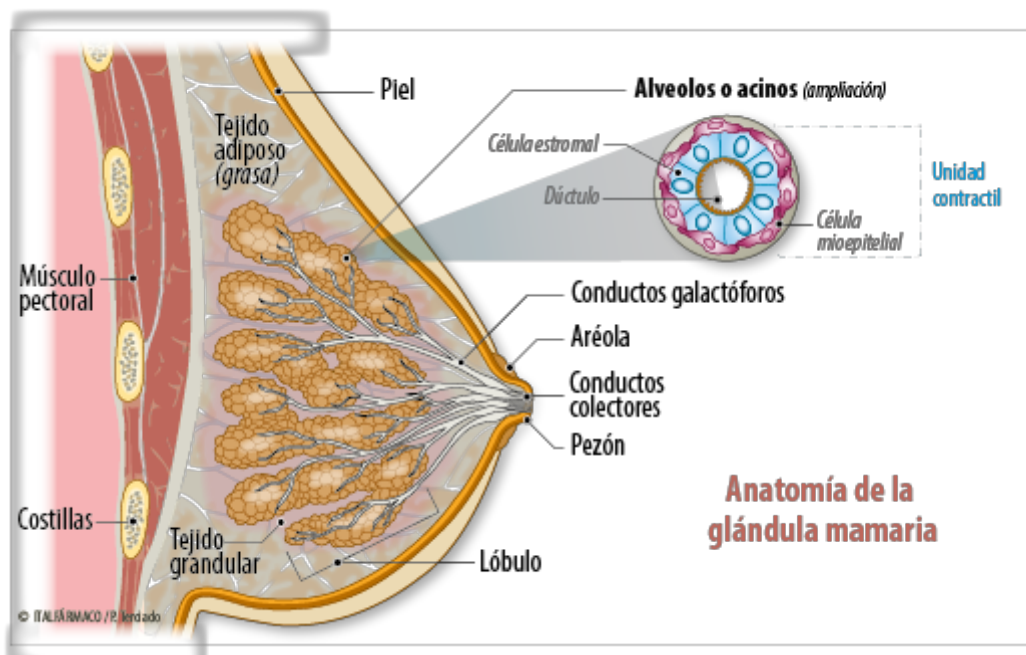


Figura 1. Anatomía de glándula mamaria. Interior de una glándula mamaria y ampliación de los alveolos (Brenes Sánchez, 2019).

Los lóbulos de la glándula mamaria son glándulas tubuloacinares compuestas que contienen acinos múltiples donde se produce la leche y es almacenada durante la

lactancia. Estos son drenados por una red de pequeños ductos (conductos intralobulares) que se unen para formar un solo conducto que drena cada lóbulo (ducto interlobular) (Darlington, 2015); estos conductos están rodeados por músculo liso en la región del pezón, cuya contracción hace que el pezón se vuelva erecto. La luz se vuelve más prominente durante el punto medio del ciclo menstrual (Paxton, Adele & Peckham, 2018).

2. Cáncer de mama

El cáncer de mama se origina generalmente en las células luminales epiteliales, responsables de la formación de glándulas productoras de leche, o en los conductos (células mioepiteliales) que son las vías que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón (Fig. 1). Con menos frecuencia, el cáncer puede originarse en los tejidos estromales, los cuales incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama (Sharma, et al., 2010).

El desarrollo de perfiles moleculares de expresión génica mediante microarreglos de DNA demostró que el cáncer de mama puede clasificarse en al menos cinco subtipos (Tabla 1): luminal A, luminal B, HER2, basal y bajo en claudina esto debido a la heterogeneidad, la expresión inmunohistoquímica del ER α , el receptor de progesterona (PR) y HER2 (Holliday & Speirs, 2011).

Los tumores luminales son ER α positivos, el subtipo luminal A es PR positivo y HER2 negativo, sin embargo son los de mejor pronóstico (menos agresivo); mientras que los tumores luminal B tienen un pronóstico desfavorable por ser PR positivos o PR negativos y HER2 positivos o negativos, pero con un alto porcentaje de expresión de Ki-67 (marcador de proliferación). Los subtipos difieren en su complejidad genómica, alteraciones genéticas clave y pronóstico, sin embargo los pacientes con tumores luminales tipo A tienen mejores tasas de supervivencia en comparación con otros grupos (Vuong, et al., 2014).

Clasificación	Inmunoperfil	Otras características	Ejemplos de líneas celulares
Luminal A	ER+, HER2- PR+/-	Baja expresión Ki67, respuesta a tratamiento endócrino y a menudo a quimioterapia.	MCF7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, HER2+ PR+/-	Alta expresión Ki67, usualmente responde a tratamiento endócrino, variable respuesta a quimioterapia. HER2+ responde a trastuzumab.	BT474, ZR75
Basal	ER-, HER2- PR-	CK 5/6+, EGFR+, alta expresión Ki67, no responde a tratamiento endócrino, a menudo a quimioterapia.	MDA-MB-468, SUM190
Bajo claudina	ER-, HER2- PR-	Baja expresión de Ki67, E-caderina, Claudina 3, 4 y 7. Respuesta inmediata a quimioterapia.	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM 1315
HER2	ER-, HER2+ PR-	Alta expresión de Ki67, responde a trastuzumab y quimioterapia.	SKR3, MDA-MB-453

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2, receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

Tabla 1. Clasificación molecular del carcinoma de mama. (Holliday & Speirs, 2011)

El blanco terapéutico utilizado en los tumores de cáncer de mama luminal es el ER α . Los pacientes con cáncer de mama son tratados con antagonistas del ER α como el tamoxifeno, el cual tras unirse al receptor bloquea las acciones proliferativas del E₂ en el epitelio mamario (Chang, 2012). Aunque los tratamientos dirigidos hacia el ER α han incrementado la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, la respuesta a la terapia es variable y la resistencia a la terapia hormonal es muy común (Serandour, et al., 2018).

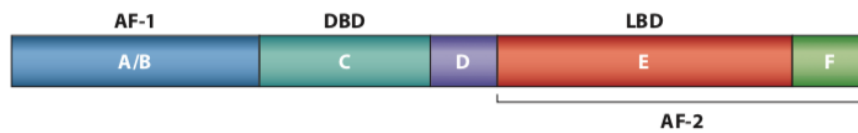
3. Mecanismos de regulación transcripcional mediada por receptores nucleares de hormonas: el receptor de estrógenos.

El ER α es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. El ER de mamíferos es codificado por dos genes (ER α y ER β) y ambos funcionan como transductores y factores de transcripción a la vez para modular la expresión de un gen específico (Liang & Shang, 2013).

Los ER α y ER β son codificados por ESR1 y ESR2, respectivamente; cada gen se localiza en un cromosoma diferente. Ambos receptores se expresan ampliamente en muchos tejidos, como el útero, ovario, glándula mamaria, próstata, pulmón y cerebro.

La diferencia funcional principal entre el ER α y el ER β parece ser determinada por la función de activación transcripcional hormonal e independiente (AF-1) en sus secuencias amino terminal respectivas, sin embargo tienen el mismo dominio de unión al DNA (DBD) en la región central y el dominio de unión al ligando (LBD) en la secuencia carboxilo terminal, la cual también tiene una función de activación transcripcional 2 (AF-2) (Fig. 2A) (Yi, et al., 2015).

A)



B)

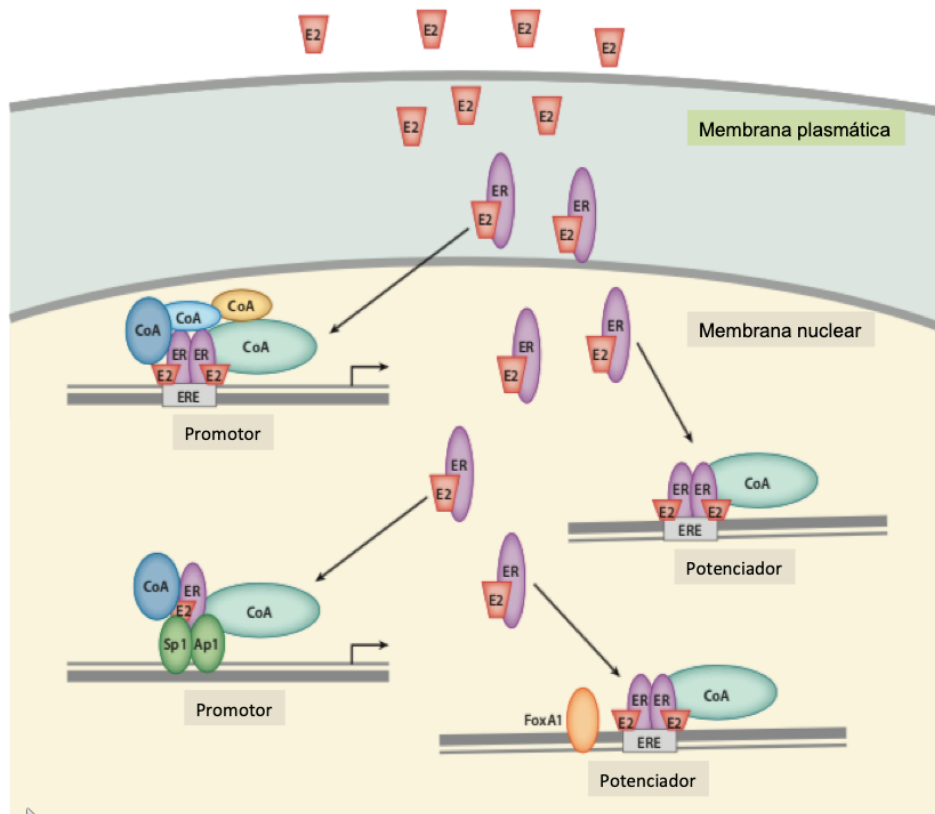


Figura 2. Mecanismos moleculares de regulación transcripcional de genes inducidos por estrógenos. A) Dominios funcionales del ER α y ER β . B) El E₂ se difunde en la célula y se une al ER (ER α /ER β). Los receptores ligados entran en el núcleo y forman complejos homodiméricos que se unen a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en los promotores génicos diana (Liang & Shang, 2013).

Uno de los factores requeridos para la activación del ER α son los estrógenos y así ejercer sus efectos principalmente en el núcleo de la célula alterando la expresión génica. Los estrógenos, a semejanza de otras hormonas esteroideas como la progesterona y el cortisol, son moléculas hidrofóbicas para disolverse en la sangre por lo que son transportados por proteínas acarreadoras específicas desde su punto de liberación hasta sus tejidos diana. En las células diana, los estrógenos pasan a través de la membrana plasmática mediante difusión simple y se unen a receptores específicos en el interior del núcleo. La unión de la hormona provoca un efecto alostérico en el receptor y de esta forma el receptor activados es capaz de interactuar con secuencias reguladoras específicas de DNA denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), alterando así la expresión génica (Fig. 2B) (Liang & Shang, 2013).

El complejo receptor-hormona formado permite el reclutamiento de coactivadores y correpresores transcripcionales. Algunos de estos corre reguladores tienen actividad enzimática capaz de modificar la estructura de la cromatina y la transcripción de sus genes blanco a través de la modificación química de las histonas que forman los nucleosomas (Nelson & Cox, 2015). La asociación del ER se puede dar en el promotor, dando inicio a la transcripción de genes a través de la interacción con los corre reguladores y la maquinaria transcripcional, o también se ha encontrado que el ER puede unirse a elementos potenciadores (enhancer) distantes de los genes diana que son regulados por el ER. (Liang & Shang, 2013).

En este trabajo nos enfocamos al estudio del ER α y su ligando con base a lo mencionado anteriormente, siendo el ER α el blanco terapéutico principal para el tratamiento contra el cáncer de mama luminal.

4. Corre reguladores transcripcionales

Una vez que esta la interacción receptor-hormona, la regulación transcripcional por parte de los receptores nucleares de hormonas implica interacciones dinámicas y ordenadas de proteína-proteína entre el receptor, los corre reguladores

asociados y la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa II en la cromatina de los genes diana (Hsia, et al., 2010). Muchos correguladores poseen actividades enzimáticas o reclutan complejos enzimáticos de proteínas para mediar modificaciones específicas de la cromatina que resultan en la activación o represión de la transcripción.

En este trabajo, nos enfocamos en el estudio de un coactivador del ER α descubierto previamente en el laboratorio. La proteína reguladora del factor 2 intercambiadora de Na⁺ / H⁺ (NHERF2), estructuralmente pertenece a una clase de proteínas que contienen múltiples dominios PDZ que funcionan como andamiajes para la formación de complejos multiproteicos en las células. NHERF2 es un coactivador de ER α que participa en el desarrollo de tumores de cáncer de mama dependientes de estrógenos. La interacción NHERF2-ER α es mediada por el carboxilo terminal del dominio PDZ2 de NHERF2 y el amino terminal del dominio AF-1 de ER α (Meneses-Morales, et al., 2014).

Los avances en la investigación de la función y los mecanismos de corregulación que tiene el ER α , permiten la extensión en la búsqueda de un tratamiento a partir de marcadores nucleares (en este trabajo, correguladores) terapéuticos contra el cáncer de mama y no solo por la clasificación de subtipos que existen para el tratamiento contra esta enfermedad.

5. Compuestos utilizados en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama

a) Coadyuvantes hormonales.

Aproximadamente 75% de los cánceres de mama están clasificados en el subtipo ER α -positivo, por lo que estos pacientes requieren principalmente de un tratamiento endocrino (Zheng, Kallio & Härkönen, 2007). El tamoxifeno es utilizado como tratamiento coadyuvante aumentando los efectos del tratamiento primario. El tamoxifeno compite con el E₂ por la unión al ER α en el tejido mamario (Fig. 3). El

tamoxifeno es el adyuvante más utilizado en la terapia endocrina y se ha demostrado que reduce sustancialmente la tasa de recurrencia en ~40% y la tasa de mortalidad de ~30% en pacientes ER α -positivo. Sin embargo, incluso con el uso de tamoxifeno durante 5 años, un tercio de los pacientes todavía recae en 15 años. Estas pacientes con resistencia endocrina pueden representar hasta una cuarta parte de todas las pacientes con cáncer de mama, lo que representa un enorme desafío clínico (Zhu, et al., 2018).

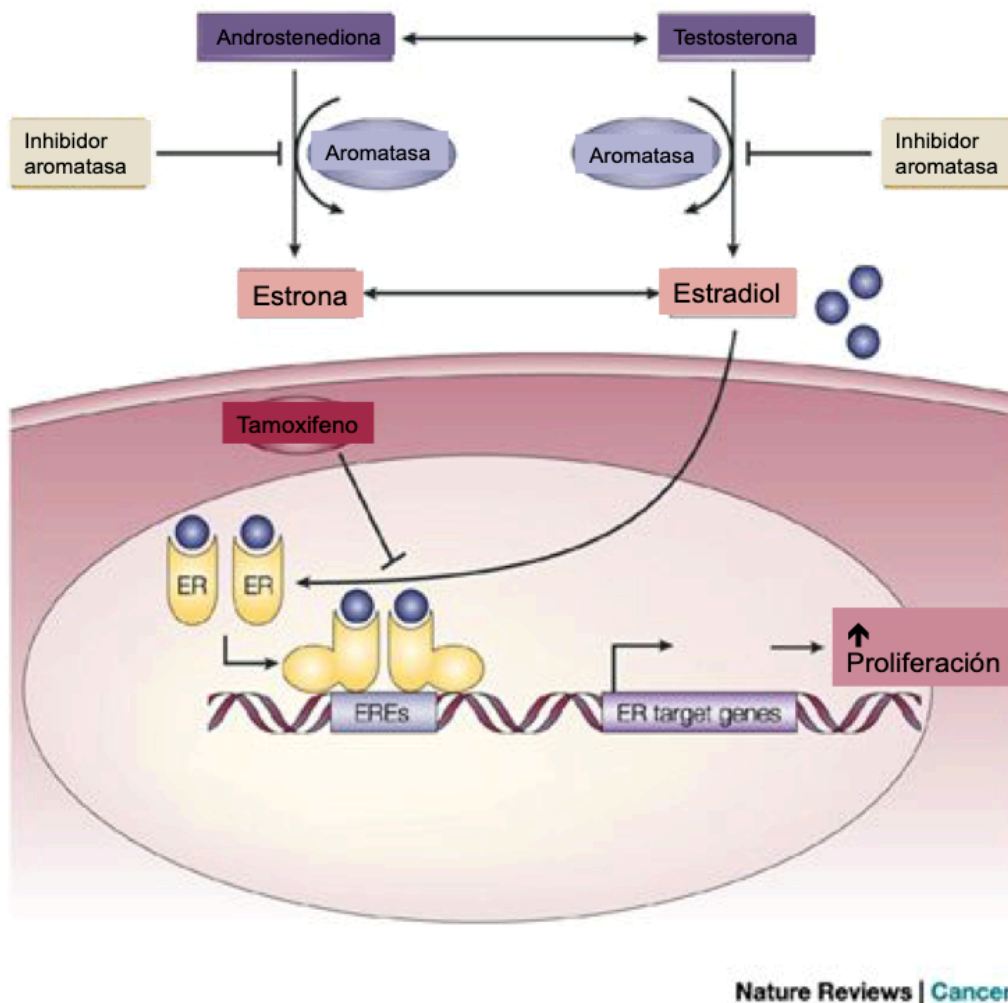


Figura 3. Mecanismo de acción del tamoxifeno. El estradiol se une a los receptores de estrógenos (ER), lo que lleva a la dimerización, el cambio conformacional y la unión a los elementos de respuesta de estrógenos (ERE) en los genes sensibles a los estrógenos, incluidos los responsables de la proliferación. El tamoxifeno compite con el estradiol por la unión al ER (Johnston & Dowsett, 2003).

A nivel molecular, la expresión alterada de cofactores del ER α , puede reprogramar el transcriptoma mediado por ER α , siendo entonces la base del desarrollo de resistencia endocrina (Wu, et al., 2017).

b) Agentes quimioterapéuticos.

El objetivo principal del uso de agentes quimioterapéuticos es inducir la apoptosis en células cancerosas (Nanayakkara, et al., 2018), incluidas las células en el sitio original del cáncer y las células cancerosas que pueden haberse diseminado a otra parte del cuerpo. La quimioterapia, es una terapia sistémica, lo que afecta a todo el cuerpo yendo a través del torrente sanguíneo (IQWiG, 2016). Sin embargo, hay que recalcar que no todas las mujeres con cáncer de mama necesitarán de un tratamiento quimioterapéutico, sino cuando es recomendable el uso de ésta:

- Después de la cirugía (quimioterapia **adyuvante**): se usa para tratar de eliminar cualquier célula cancerosa que haya quedado o se haya propagado después de la cirugía y así evitar la formación de tumores en otros lugares del cuerpo. La quimioterapia adyuvante tiene como objetivo prevenir recurrencias.
- Antes de la cirugía (quimioterapia **neoadyuvante**): la quimioterapia neoadyuvante se usa antes de la cirugía y para tratar cánceres que son demasiado grandes para ser extirpados mediante cirugía al momento del diagnóstico (llamados cánceres localmente avanzados). Este tipo de tratamiento puede reducir el tamaño del tumor, lo que hace posible su extirpación quirúrgica. La quimioterapia neoadyuvante puede reducir el riesgo de que regrese el cáncer de mama.
- Para el cáncer de mama avanzado: la quimioterapia se puede utilizar como el tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se ha diseminado fuera del área del seno y la axila, ya sea cuando se diagnostica o después de los tratamientos iniciales.

Sin embargo, la recurrencia y la resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos son dos de los factores más prominentes que sustentan las altas tasas de mortalidad asociadas con la mayoría de los cánceres de mama (IQWiG, 2016; Wang, et al., 2017).

Los quimioterapéuticos presentan distintos mecanismos de acción, en esta trabajo se presentan tres de los fármacos más utilizados en la terapia clínica; paclitaxel, fluorouracilo (5-FU) y cisplatino, teniendo cada uno de ellos un blanco molecular diferente para producir la muerte celular.

i. Paclitaxel

El paclitaxel se une a β -tubulina previniendo la despolimerización y de esta manera causando la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Khongkow, et al., 2013). Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos formados por dos proteínas globulares, α - y β -tubulina desempeñando una amplia variedad de funciones dinámicas y estructurales esenciales en células eucariotas. Durante la mitosis, los microtúbulos forman el eje mitótico dinámico que se encarga de separar los cromosomas entre las dos células hijas. Debido a este papel en la estructura y dinámica del huso mitótico, la alteración de los microtúbulos por el paclitaxel o cualquier taxano induce la detención mitótica crónica, el bloqueo entre las fases G2 y M del ciclo celular y finalmente la muerte celular por apoptosis, lo que los convierte en un objetivo preferencial para la terapia del cáncer (Fonseca, et al., 2016).

ii. Fluorouracilo

El antimetabolito 5-fluorouracilo (5-FU), un análogo del uracilo, y sus profármacos, son agentes antineoplásicos ampliamente utilizados para el tratamiento de cánceres gastrointestinales, tumores de mama y ginecológicos.

La disponibilidad de 5-FU para el anabolismo intracelular depende principalmente del catabolismo de los fármacos en los tejidos. El metabolismo de 5-FU tiene una activación preferencial en los tumores debido a la distribución tisular de la enzima timidina fosforilasa (TP). El 5-FU actúa durante la fase S del ciclo celular inhibiendo la síntesis de DNA al restringir la disponibilidad de timidilato sintasa. El 5-FU también puede inhibir la síntesis, el procesamiento y la función del RNA. La TP se expresa en niveles bajos en muchos tejidos en todo el cuerpo y en altas concentraciones en la mayoría de los tejidos tumorales, lo que lleva a la acumulación de 5-FU en los tumores (Focaccetti, et al., 2015).

iii. Cisplatino

Como tercer fármaco quimioterapéutico, el cisplatino es un agente citotóxico alquilante que activa múltiples vías intracelulares incluyendo supresor de tumores p53, la vía de las MAP cinasas, y otras vías de regulación del ciclo celular de proteínas y caspasas. El resultado de la señalización inducida por el cisplatino suele ser la detención del ciclo celular, la reparación del DNA y finalmente la apoptosis y la muerte celular (Yde & Issinger, 2006).

Aunque se sabe que el DNA es un importante blanco molecular para el cisplatino, los mecanismos de acción de los complejos de platino actúan principalmente al dirigirse a la membrana mitocondrial de células cancerosas y sólo del 5-10% de concentración intracelular de cisplatino se encuentra en el DNA, mientras que el 75-85% se une a sitios nucleofílicos de los constituyentes intracelulares como lo es el grupo tiol que se encuentra en las proteínas y los componentes de DNA y RNA. Esta unión preferencial ofrece la explicación de la resistencia al cisplatino, pero también su alta toxicidad (Zaki, Arjmand & Tabassum, 2016).

6. Línea celular MCF7 y sobreexpresante de NHERF2

a) Línea celular MCF7

Las células MCF7 fueron aisladas del derrame pleural de una mujer de 69 años con enfermedad metastásica. La paciente se había sometido a una mastectomía

de su seno derecho para un tumor benigno 7 años antes de que se iniciara el cultivo primario de células y a una mastectomía radical consecutiva de su seno izquierdo por un adenocarcinoma maligno 4 años después.

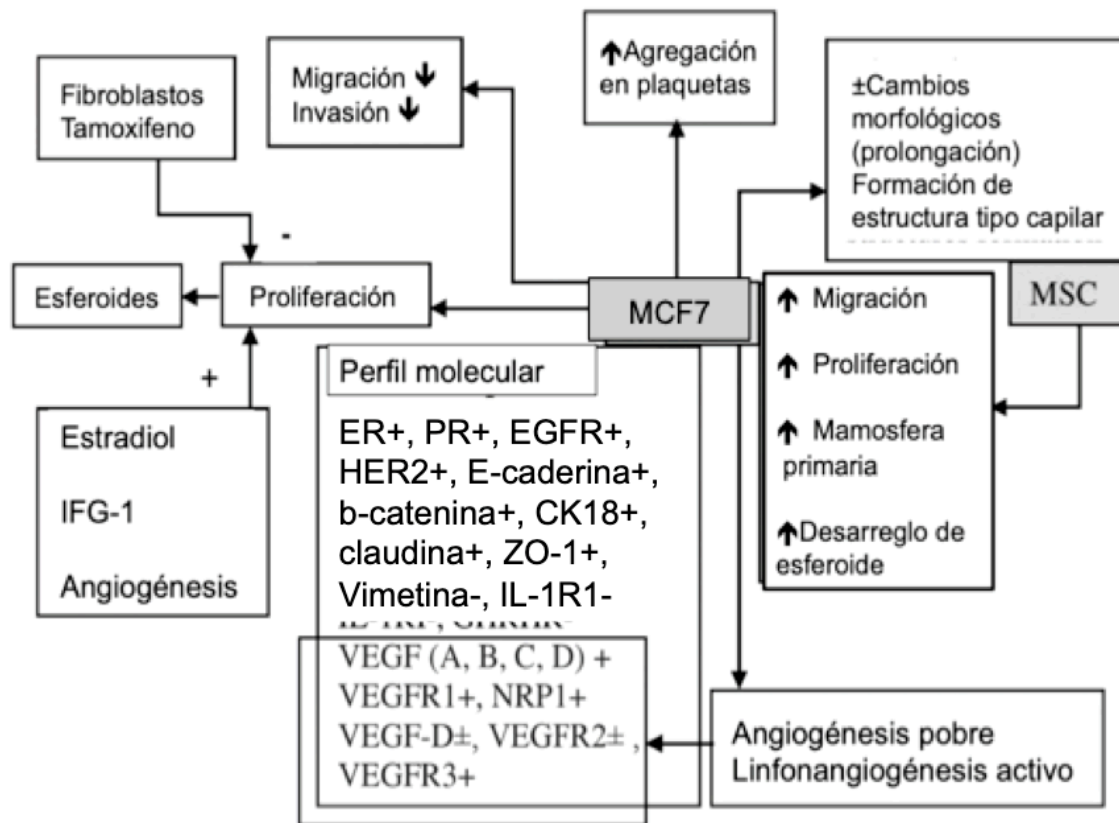


Figura 4. El perfil molecular y las propiedades de la célula MCF7, así como la interacción entre la MCF7 y las células madre mesenquimales. (MSC, células madre mesenquimales; ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; EGFR, receptor del factor de crecimiento epitelial; HER2, receptor del factor de crecimiento epitelial humano 2; CK 18, citoqueratina 18; ZO-1, zonula ocludens; IL-1RI, receptor de interleucina 1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR, receptor de VEGF; NRP1, neuropilina 1; IFG-1, factor de crecimiento similar a la insulina 1). (Comşa, Cîmpean & Raica, 2018)

El uso de MCF7 ha producido más datos de conocimiento práctico para el cuidado de pacientes que cualquier otra línea celular de cáncer de mama (Fig. 4). Es ER-positivo y positivo para el PR y pertenece al subtipo molecular luminal A. La MCF7 es una línea celular poco agresiva y no invasiva, que normalmente se considera de bajo potencial metastásico (Sweeney, et al., 2012).

Las células MCF7 contienen una fracción de células madre capaces de generar variabilidad clonal. Esto se propuso como una explicación para la heterogeneidad de esta línea celular y como un modelo para la heterogeneidad del tumor de mama (Fig. 4). Diferentes variantes del MCF7 sufren divergencias tanto a nivel genómico como a nivel de expresión del RNA (Nugoli, et al., 2003).

b) Línea celular MCF7 sobreexpresante de NHERF2

En esta trabajo se utilizó, el uso de la línea celular MCF7 sobreexpresante del coactivador NHERF2, en la cual se observa un incremento de la transcripción de genes endógenos dependientes de E_2 y estimulación de la proliferación celular y la formación de tumores (Meneses-Morales, et al., 2014). Actualmente, se sabe que más de 30 proteínas, incluyendo receptores de membrana, proteínas cinasas, transportadores y canales, interactúan con NHERF1/2. Una de las principales funciones de NHERF1/2 es reclutar y organizar espacialmente proteínas de señalización que alteran las funciones de las proteínas o las vías de señalización que se originan en los receptores (Yoshida et al., 2016).

7. Modelos experimentales para el estudio de cáncer de mama.

Cultivos celulares 2D y 3D

Los modelos de cáncer más simples son líneas celulares derivadas de tumores humanos y animales que crecen como monocapas planas sumergidas en los medios. En esta configuración, las células se adhieren a un plástico artificial o sustrato de vidrio y en contacto con otras células solo en su periferia.

En este modelo las células crecen en un medio de cultivo uniforme y no existen gradientes de oxígeno, nutrimentos o residuos. Las células cultivadas en capas planas es un modelo accesible, fácil de manejo pero no refleja el microambiente multicelular que se encuentra en los tumores (Breslin and O'Driscoll, 2016).

Los esferoides cultivados en cultivos tridimensionales (Fig. 5) presentan un perfil de expresión génica que se asemeja más a los tumores humanos que las células cultivadas en monocapa (Blanchette-Farra et al., 2018).

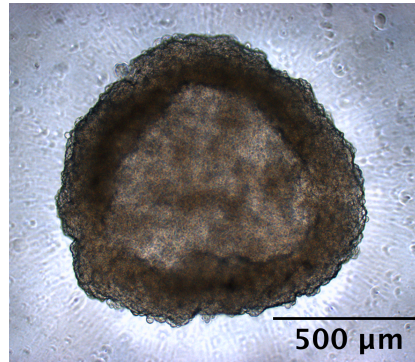


Figura 5. Cultivo 3D. Esferoide realizado a partir de 20,000 células MCF7/NHERF2

Estos esferoides tridimensionales de cáncer tienen varios rasgos fisiológicos similares a los tumores, incluso morfología total, formación de contacto célula-célula, proliferación de las células periféricas y centro hipóxico (Reynolds et al., 2017).

Una característica que distingue los esferoides tridimensionales de los cultivos en monocapa es la disminución de oxígeno (hipoxia) en el centro. Esencialmente, este centro hipóxico está también presente en los tumores *in vivo*, donde las células superan rápidamente los suministros de sangre, dejando las células en el centro del tumor en un ambiente con una concentración extremadamente baja de oxígeno (Reynolds et al., 2017).

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres en edad reproductiva y representa el 16 % de los tumores malignos diagnosticados. En México, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia en mujeres desde el año 2016 y las tasa de mortalidad por esta enfermedad ha aumentado significativamente en el período 2011 a 2016 (INEGI, 2018). La tasa de mortalidad por cáncer de mama en México es el resultado de factores genéticos, medioambientales y de un deficiente diagnóstico. Sin embargo en un porcentaje elevado la mortalidad por esta enfermedad se debe a una respuesta incompleta de las pacientes al tratamiento hormonal o con agentes quimioterapéuticos. Hasta el día de hoy no existe un método completamente eficaz para identificar a las pacientes que desarrollan tumores resistentes al tratamiento y el modelo más utilizado para caracterizar células cancerosas, sus propiedades proliferativas y de diferenciación así como también la respuesta a tratamientos hormonales y quimioterapéuticos es en cultivos bidimensionales, los cuales no son capaces de igualar el ambiente tumoral. El desarrollo de un sistema experimental que tenga la capacidad de realizar lo dicho anteriormente mostrando la accesibilidad de sus células a diferentes tratamientos es de importancia oncológica y experimental y corresponde a la meta científica del presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha propuesto el modelo 3D para el estudio de cáncer de mama, pues al ser una enfermedad compleja y heterogénea, las condiciones que asemeja este tipo de técnica sirve para la identificación de blancos terapéuticos a través de la expresión de receptores, proteínas esenciales para la supervivencia de las células, así como la actividad de las enzimas responsables del metabolismo de fármacos.

Para este trabajo se utilizaron cultivos 2D y 3D de células MCF7 (luminal A) y células MCF7/NHERF2. Se estudió su viabilidad cuando éstas eran expuestas a estradiol, el antagonista estrogénico tamoxifeno y agentes quimioterapéuticos. Los cultivos celulares fueron comparados con respecto a su viabilidad, formación de esferoides y respuesta a tratamientos farmacológicos utilizados en el manejo del paciente con cáncer de mama.

HIPÓTESIS

- La sobreexpresión del coactivador NHERF2 promoverá la viabilidad y la resistencia a tamoxifeno en esferoides o cultivos tridimensionales de la línea celular MCF7 de cáncer de mama en comparación a un cultivo monocapa, mientras que para los agentes quimioterapéuticos (paclitaxel, fluorouracilo y cisplatino), se espera que no haya diferencia entre las líneas celulares por ser fármacos que tienen un mecanismo de acción en la replicación de DNA y división celular.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la viabilidad que tienen los cultivos tridimensionales de células MCF7 y MCF7/NHERF2 con cultivos celulares 2D cuando éstos están en presencia de agentes utilizados en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un modelo tridimensional *in vitro* (esferoides) para hacer una comparación morfológica entre las células control MCF7 y MCF7/NHERF2.
- Estudiar la viabilidad de los esferoides en condiciones normales y compararla cuando éstos estén en presencia de estradiol, tamoxifeno y distintos quimioterapéuticos.
- Comparar la viabilidad de las células MCF7 y MCF7/NHERF con los tratamientos mencionados anteriormente entre el cultivo de monocapa y el cultivo tridimensional.
- Realizar un análisis bioinformático sobre la repercusión que tienen las mujeres con cáncer de mama y que sobreexpresan la proteína NHERF2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos del trabajo se planteó la estrategia experimental de la Figura 6.

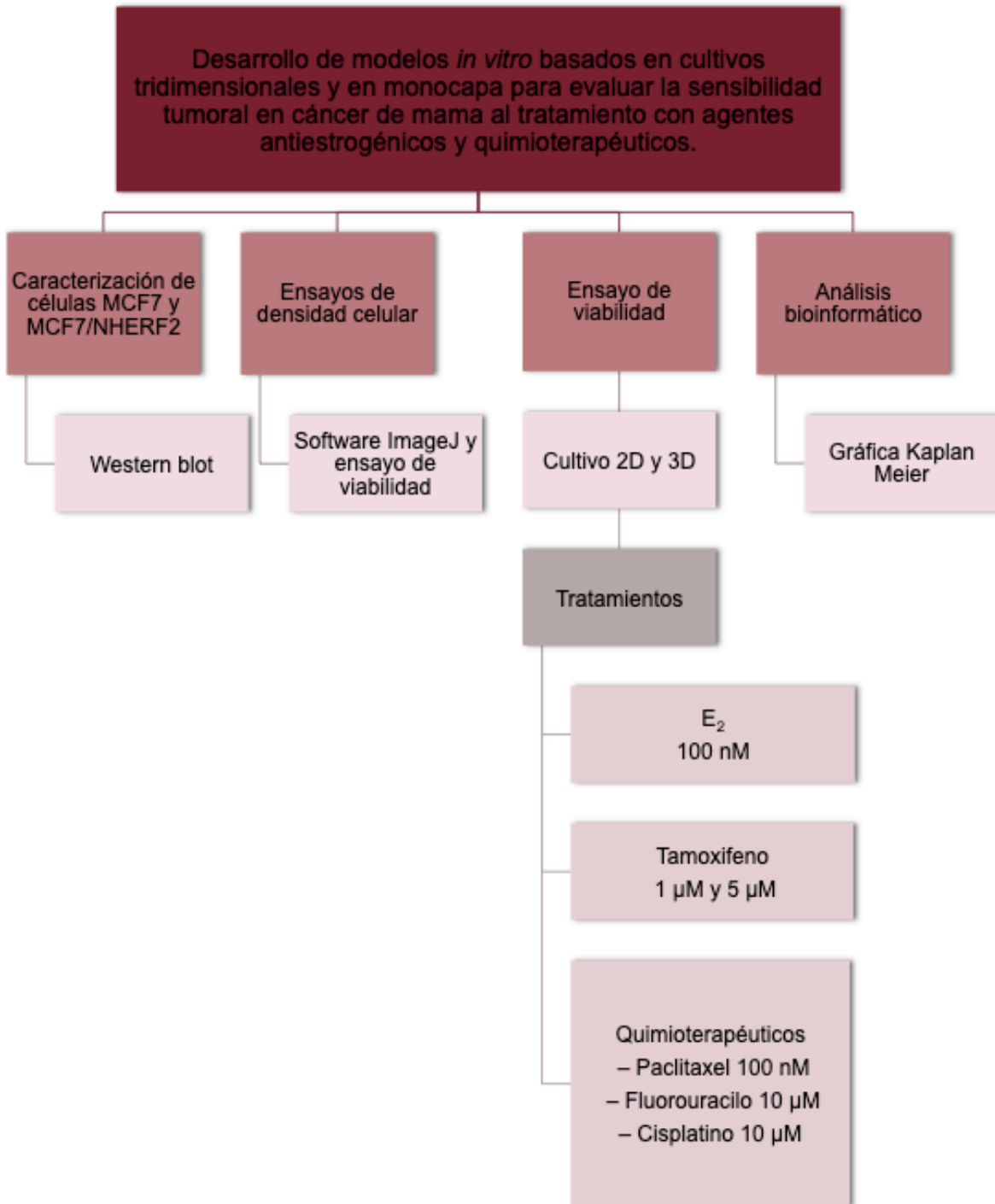


Figura 6. Diseño experimental seguido para alcanzar los objetivos del trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

– Reactivos y anticuerpos

El estradiol (17β -estradiol), el 4-hidroxitamoxifeno (tamoxifeno) y la geneticina (G418) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (MERCK). El reactivo utilizado para los ensayos de viabilidad PrestoBlue basado en el colorante resazurina fue obtenido de Invitrogen. Anticuerpos: El anticuerpo monoclonal anti-NHERF2 fue adquirido de Cell Signaling Technology y el anticuerpo α -tubulina fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology.

– Líneas celulares y cultivo celular

La línea celular MCF7 fue obtenida del panel celular del cáncer de mama ATCC 30-4500K, descongeladas y cultivadas. Las células sobreexpresantes de NHERF2 fueron obtenidas previamente a través de una transfección estable de la región codificadora de NHERF2 humana clonada en el plásmido pcDNA 3.1.

El cultivo celular de las células MCF7y las MCF7/NHERF2 fue en cajas Petri de 100 mm en medio DMEM con rojo fenol, suero fetal bovino (SFB) 10 %, E_2 100 nM y en el caso de MCF7/NHERF2 con geneticina (G418) 10 μ g/ml a 37 °C y 5 % de CO_2 .

– Conteo celular

Las células previamente cultivadas en cajas Petri de 100 mm, fueron lavadas dos veces con solución salina de fosfatos (PBS) y tripsinizadas. Las células fueron contadas por el equipo TC20 de BIORAD y sembradas en cajas de 96 pozos ya fuera para el ensayo en monocapa (placas con fondo plano) o para la formación de los esferoides en placas de 96 pozos *Corning Spheroid Microplates* en medio DMEM, SFB 5% o SFB tratado con carbón activado y dextrano (SFBt) 5 % a 37°C y 5 % de CO_2 . El número de células utilizadas variaba según fuera el experimento. Se estuvieron cultivando entre 2,500 y hasta 25,000 células/pozo.

Para los experimentos en monocapa, debido al diámetro del pozo y por el tiempo que se trataron las células, se cultivaron 7,500 células/pozo.

– Tratamiento con estradiol y tamoxifeno

Una vez alcanzada la confluencia de 60-70 % las cajas de 100 mm se mantuvieron por 48 h en medio DMEM con SFBt 5 % a 37°C y 5 % de CO₂, para abstenerlas de los estímulos.

Para la realización de los ensayos de cultivos tridimensionales y la comparación en cultivos de monocapa en presencia de estradiol o tamoxifeno se cultivaron 20,000 o 7,500 células/pozo según fuera el caso en medio DMEM con SFBt 5 % a 37°C y 5 % de CO₂. Para los ensayos de E₂ se utilizó una concentración de 100 nM, mientras que en el caso de tamoxifeno se utilizaron las concentraciones de 1 y 5 µM. El tratamiento se realizó por un máximo de 9 días. El ensayo de viabilidad se realizó con el reactivo PrestoBlue reportando la viabilidad a partir del tercer día seguido cada 48 h, tomando como 100 % de viabilidad a los esferoides que se mantuvieron en solo medio y en comparación con el vehículo de cada día de tratamiento. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron al menos 2 veces.

– Tratamientos con quimioterapéuticos

Los quimioterapéuticos utilizados (paclitaxel sol. 30 mg inyectable, fluorouracilo sol. inyectable 250 mg/10 ml y cisplatino 10 mg sol. inyectable) fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Coordinador de la Unidad de Bioquímica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ. En el caso de paclitaxel se utilizó una concentración de 100 nM; para el 5-FU fue de 10 µM y en cisplatino 10 µM. El tratamiento se realizó de igual manera por un máximo de 9 días para después realizar el ensayo de viabilidad tomando como 100 % de viabilidad a los esferoides que se mantuvieron en solo medio y en comparación con el vehículo de cada día

de tratamiento. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron al menos 2 veces.

- Medición de los esferoides

Las observaciones e imágenes adquiridas para hacer las mediciones fueron obtenidas con un microscopio invertido en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas a cargo del Dr. Miguel Tapia Rodríguez. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ. A partir de este análisis se obtuvieron los resultados de área, perímetro y tamaño real de los esferoides formados. El equipo y el software fue utilizado a lo largo del experimento para ir monitoreando la formación y el tamaño de los esferoides. Las mediciones realizadas se hicieron solo una vez por experimento, siendo los esferoides de las imágenes los analizados.

- Ensayo de viabilidad

La viabilidad se evaluó con el uso del reactivo PrestoBlue (resazurina) de acuerdo al protocolo del proveedor. Como primera parte, se midió la viabilidad de los esferoides a diferentes concentraciones de células y sin ningún tratamiento para observar la viabilidad basal y después en presencia de los diferentes tratamientos.

Se añadió a los pozos el 10 % del volumen para ambos modelos de cultivo con la diferencia del tiempo de incubación. En los ensayos de monocapa, se dejó incubando el reactivo 20 min. antes de hacer la lectura, mientras que en los esferoides se mantuvo incubando por 4 h (Thakuri, et al., 2016).

- Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados por medio del programa STATGRAPHICS Plus a través de un análisis de varianza por una ANOVA Factorial con una $p < 0.05$ considerándose significativa.

RESULTADOS

1. Detección por inmunoréplica tipo western de los niveles de expresión de la proteína coactivadora NHERF2 en células MCF7 y MCF7/NHERF2

Para caracterizar las células MCF7 y las sobreexpresantes MCF7/NHERF2 se verificó la expresión de las células transfectadas con el vector de NHERF2. Como se muestra en la Fig. 7 se observó que los niveles de expresión de la proteína son mayores en las células transfectadas con el vector de NHERF2 a diferencia de las células control.

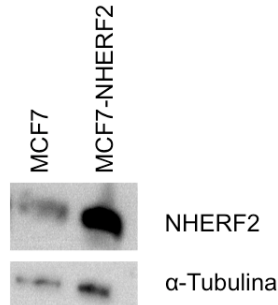


Figura 7. Western Blot. Niveles de expresión de la proteína NHERF2 para la caracterización de las células MCF7 y MCF7/NHERF2. Como proteína control se detectó la proteína α -Tubulina

2. Efecto de número de células en la formación y diferenciación de los esferoides entre las células MCF7 y MCF7 sobreexpresantes de la proteínas NHERF2

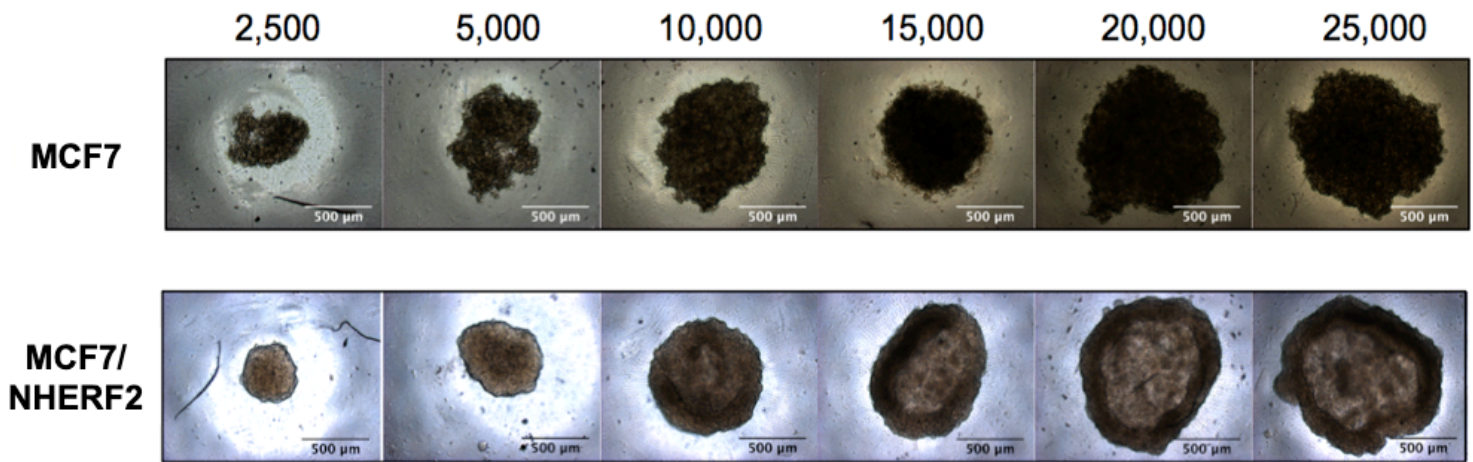
Una vez corroborada la sobreexpresión de NHERF2 en las células MCF7 transformadas se sembraron tanto esta como la línea MCF7 silvestre para la formación de los esferoides en una curva de densidad utilizando 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 25000 células. Se observó una diferencia morfológica entre MCF7 y la MCF7/NHERF2 después de 3 días, pues este fue el tiempo que tardaron las células control para presentar una morfología parecida al esferoide (Fig. 8A).

A los esferoides del inciso A) de la Fig. 8, se les midió el perímetro y área al tercer día para realizar una comparación entre ambas líneas. A partir de 10,000

células se observó una disimilitud en los parámetros mencionados entre los esferoides de células control y las sobreexpresantes (Fig. 8B). Como se observa en la Fig. 8A a las células MCF7/NHERF2 presentaron una morfología más compacta que las MCF7, además de tener un perímetro y área mayor.

A)

Día 3



B)

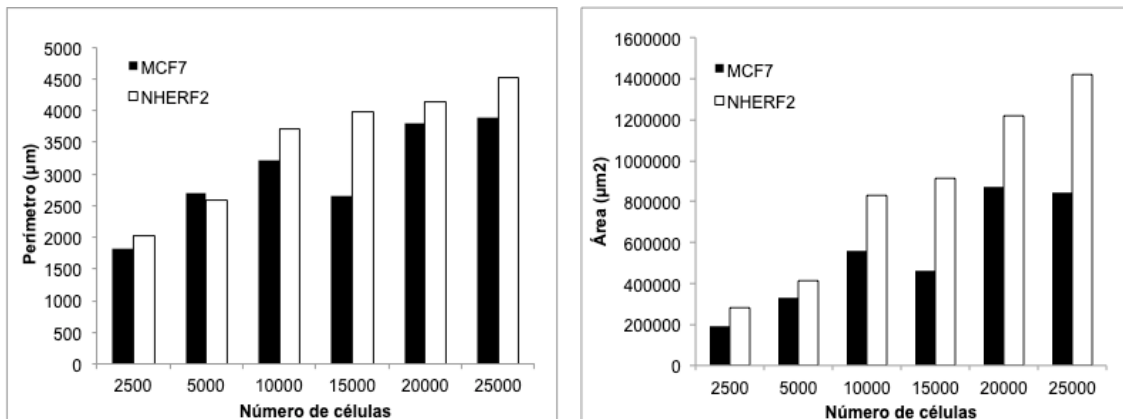


Figura 8. Densidad celular y diferenciación. A) Ensayo de densidad celular en células MCF7 y MCF7-NHERF2. Fotografías obtenidas al tercer día que se sembraron las células en placas de 96 pozos de *Corning Spheroid Microplates*. B) Gráficas de perímetro y área de los esferoides formados al tercer día. Los datos se obtuvieron de las fotografías presentadas en el inciso A. y a través del programa ImageJ.

3. Viabilidad en cultivos tridimensionales en células MCF7 y MCF7/NHERF2

Estudiamos la respuesta que había con respecto al número de células para la formación de esferoides y la viabilidad celular a través del tiempo. Como se muestra en la Fig. 9, se tomó el 100 % de viabilidad al menor número de células (2,500 células) en el día 1. La viabilidad con respecto al tiempo no presentaron una diferencia significativa a excepción del día 5 con 25,000 células. El ensayo fue realizado en medio DMEM bajo en glucosa y SFB 5 %.

Con estos resultados y teniendo las características físicas de los cultivos tridimensionales, se decidió utilizar 20,000 células para proseguir con los ensayos de viabilidad cuando éstos estuvieran expuestos a estradiol, tamoxifeno o agentes quimioterapéuticos y medir su viabilidad.

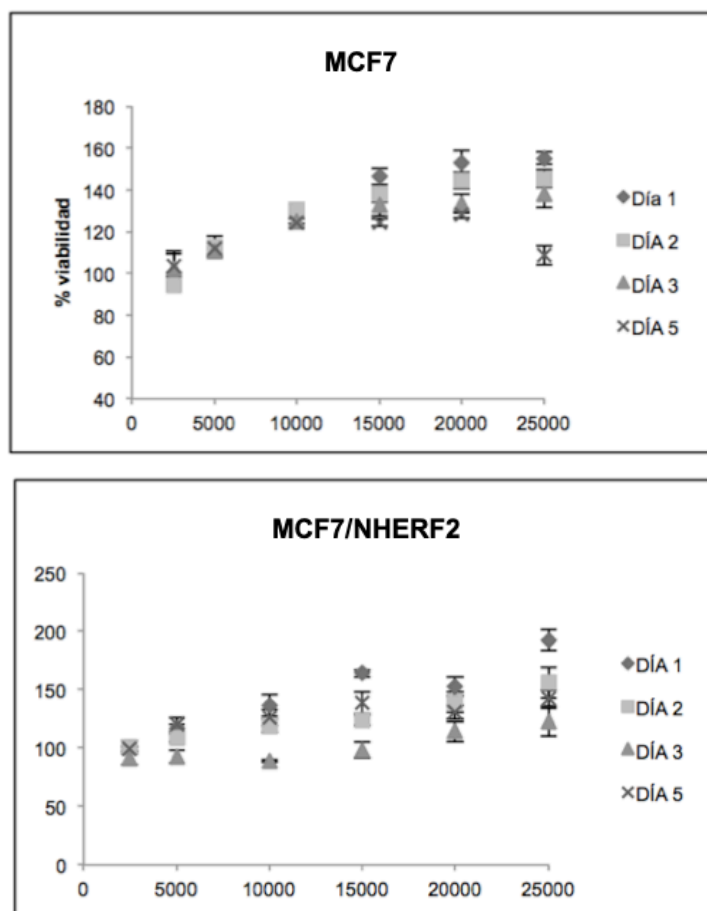


Figura 9. Gráficas de viabilidad a través del tiempo de cultivos 3D en células MCF7 y MCF7-NHERF2

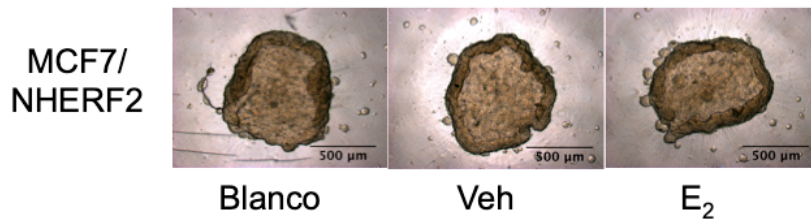
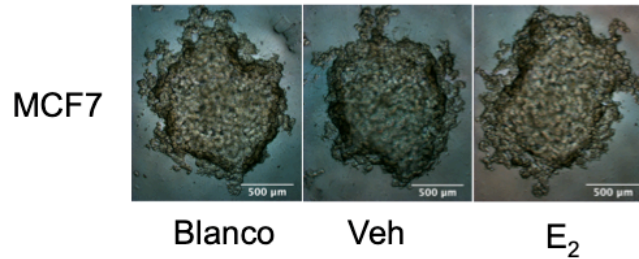
4. Efecto del estradiol sobre la viabilidad celular en cultivos monocapa y tridimensionales de células MCF7 y MCF7/NHERF2

Para determinar el efecto del estradiol en los esferoides y la viabilidad celular se cultivaron 20,000 células en presencia de E₂ 100 nM y se determinó la viabilidad a partir del tercer día y cada 48 h. Estos resultados se compararon con la viabilidad en los cultivos monocapa de células control MCF7 y las sobreexpresantes de NHERF2. En presencia de estradiol la viabilidad de estas células se esperaba que se mantuviera en un 100 % a lo largo del experimento.

4.1. Esferoides en presencia de estradiol

Los esferoides mostrados en la Fig. 10 fueron obtenidos al tercer y noveno día con medio, vehículo (en este caso etanol) o en presencia de E₂ 100 nM. Las células MCF7 presentan una morfología menos compacta sin bordes definidos a comparación de los esferoides de NHERF2, lo que sugiere que la estructura se debe a la sobreexpresión de NHERF2 y no al estradiol como se observó en la Figura 8A. Por otra parte, el tiempo modificó la estructura de los esferoides en ambas líneas y para corroborar esto en la tabla 2, se muestra que el área de los esferoides disminuye, pues se mostraron más compactos y con un centro necrótico más definido.

Tratamiento. Estradiol
Día 3



Tratamiento. Estradiol
Día 9

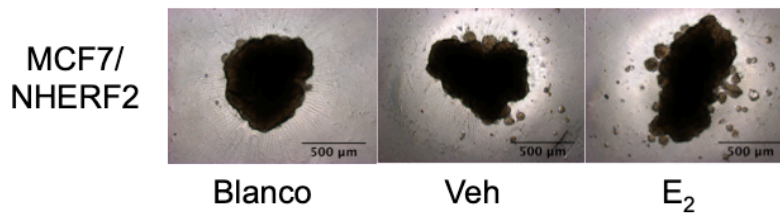
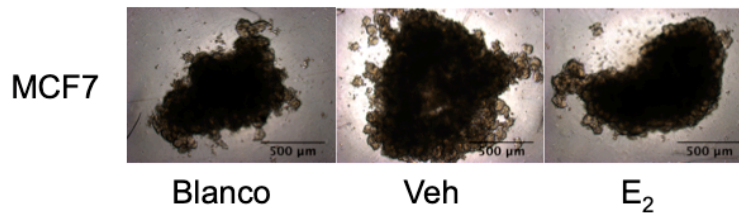


Figura 10. Cultivos 3D en presencia de estradiol. Fotografías de los cultivos 3D al tercer y noveno día en presencia del estímulo de E₂. (Blanco, células en medio DMEM con SFBt 5 % o; Veh, células en presencia de medio DMEM con SFBt 5 % y etanol; E₂, células en medio DMEM con SFBt 5 % y estradiol 100 nM)

Tabla 2. Medidas de los esferoides en la presencia de estradiol

Estradiol 100 nM	Línea celular	Día	Área (mm ²)
E ₂	MCF7	3	1290.5
		9	776.3
	NHERF2	3	545.7
		9	447.3

4.2. Efecto de la viabilidad celular entre el modelo bidimensional y el tridimensional entre las líneas celulares MCF7 y MCF7/NHERF2

La adición de estradiol en las células MCF7 monocapa mantuvo la viabilidad en un 100%, con excepción de una disminución en el día 7 en el modelo 2D, sin embargo no presentaron una diferencia significativa entre el cultivo en monocapa y tridimensional (Fig. 11). Por el otro lado, en el cultivo 2D, el E₂ aumentó la viabilidad de células MCF7/NHERF2 siendo este efecto más evidente en los días 3, 5 y 7 del cultivo y presentó una diferencia significativa entre los modelos. Por consiguiente, el estradiol promueve la viabilidad de las células y pareció afectar más a las células MCF7/NHERF2. Los resultados fueron comparados a través de una ANOVA multifactorial, por un análisis de Varianzas (P<0.05)

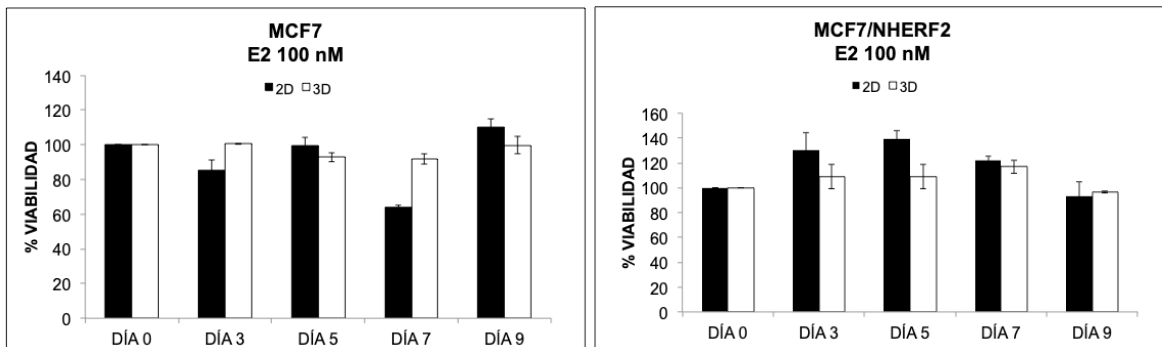


Figura 11. Viabilidad en presencia de E₂. Comparación entre los modelos 2D y 3D en las líneas celulares MCF7 y MCF7/NHERF2

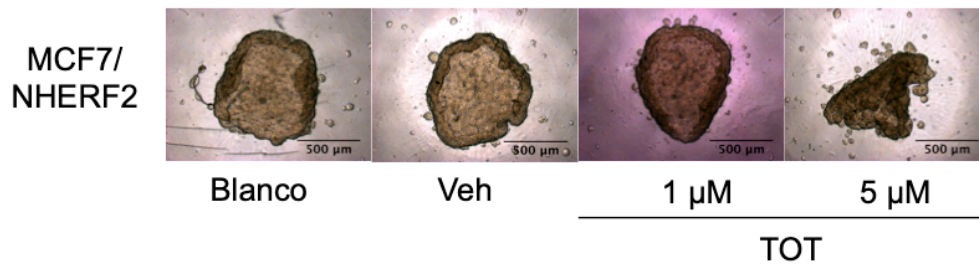
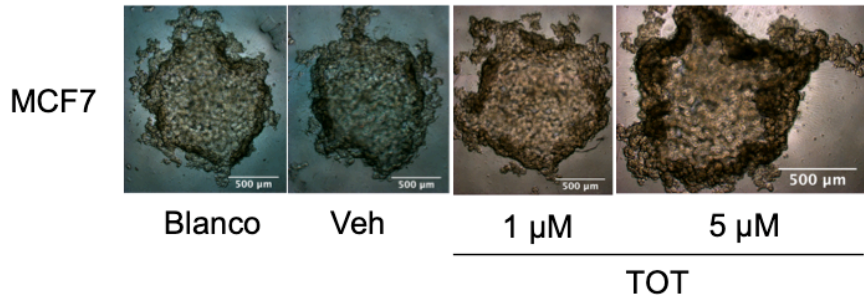
5. Sensibilidad tumoral al tratamiento antiestrogénico con tamoxifeno

Para determinar el efecto del tamoxifeno sobre la formación de esferoides y la viabilidad en ensayos monocapa y 3D, incubamos 20,000 células MCF7 y NHERF2 en un medio que contenía TOT 1 y 5 μ M desde el inicio del experimento. La viabilidad fue determinada a partir del día 3 y cada 48 h en un total de nueve días tomando en consideración que el 100 % de viabilidad eran los esferoides que solo se mantenían en medio DMEM y SFBt 5% en comparación con el vehículo.

5.1. Estructura de esferoides expuestos a tamoxifeno

Los resultados demuestran que las células MCF7/NHERF2 formaron esferoides más compactos y de morfología más definida que las células MCF7, y al término del experimento estas últimas mostraron un aparente deterioro. En los esferoides de MCF7/NHERF2 para el día 9, mostraron una mayor compactación reduciendo el área del esferoide (Fig. 12 y Tabla 3).

Tratamiento. Tamoxifeno
Día 3



Tratamiento. Tamoxifeno
Día 9

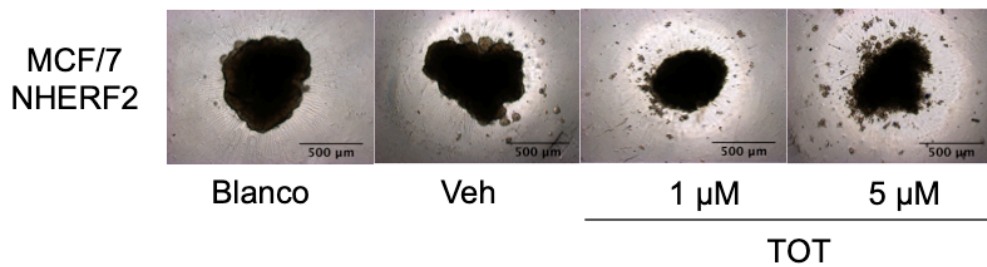
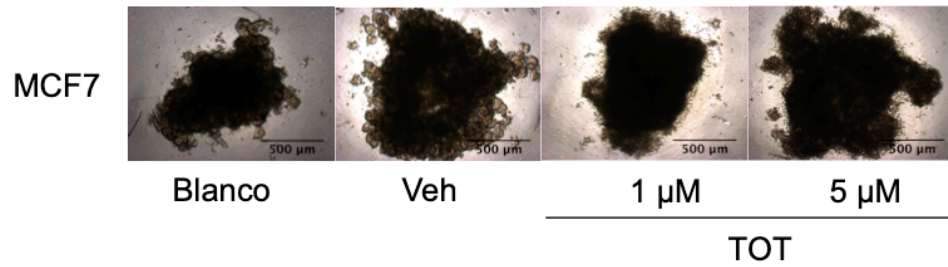


Figura 12. Cultivos 3D en presencia de tamoxifeno (TOT). Fotografías de los esferoides al tercer y noveno día de tratamiento con TOT .

Tabla 3. Medidas de los esferoides en presencia de tamoxifeno

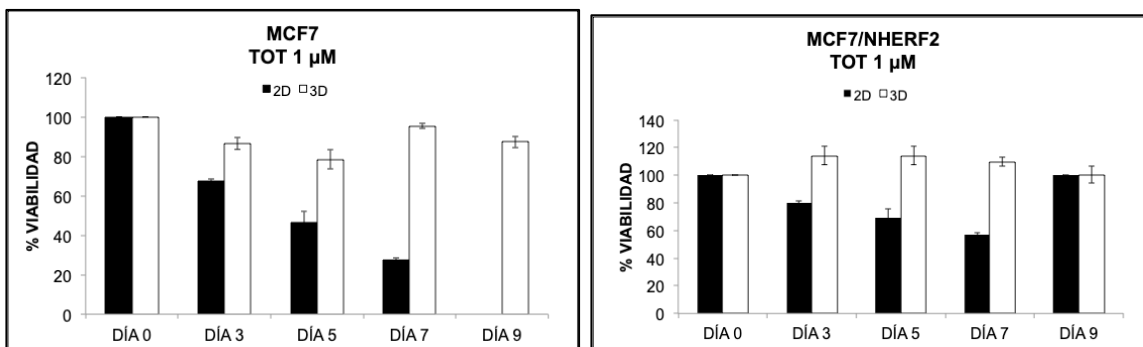
Línea celular	Concentración TOT (μM)	Día	Área (mm^2)
MCF7	1	3	1004.6
		9	690
	5	3	1124
		9	1011.3
MCF7/ NHERF2	1	3	528.7
		9	227.9
	5	3	349.6
		9	257.6

5.2. Efecto de la viabilidad celular en presencia de 1 y 5 μM de tamoxifeno en células MCF7 y células MCF7/NHERF2 en un modelo 2D y 3D

La evidencia de un efecto protector en los esferoides se demostró en ambas células, puesto que la viabilidad no disminuyó en su totalidad ni a 1 ni a 5 μM TOT. Para el caso de NHERF2 se sugiere que su expresión protege las células contra los efectos del TOT viéndose evidente en la viabilidad tanto en monocapa como en el modelo 3D.

En las células la comparación entre los modelos se encontró (Fig. 13): A) que en una concentración de TOT 1 μM , MCF7 en ambos modelos muestran progresivamente una menor viabilidad, pero la caída en viabilidad es mayor en el modelo 2D, tanto que al día 9 las células han muerto por completo teniendo una diferencia estadísticamente significativa, mientras que las células MCF7/NHERF2 a pesar de presentar una diferencia entre los modelos, no muestra una disminución por abajo del 50 % en su viabilidad. B) Para el caso de TOT 5 μM la diferencia entre los modelos bidimensional y tridimensional solo se mostró en las células MCF7 presentándose más notorio el efecto de TOT disminuyendo exponencialmente su viabilidad con respecto al tiempo. Las células MCF/NHERF2 por otra parte, no mostraron diferencia entre los modelos a esta concentración. Estos resultados fueron comparados a través de una ANOVA multifactorial, por un análisis de Varianzas ($P < 0.05$).

A)



B)

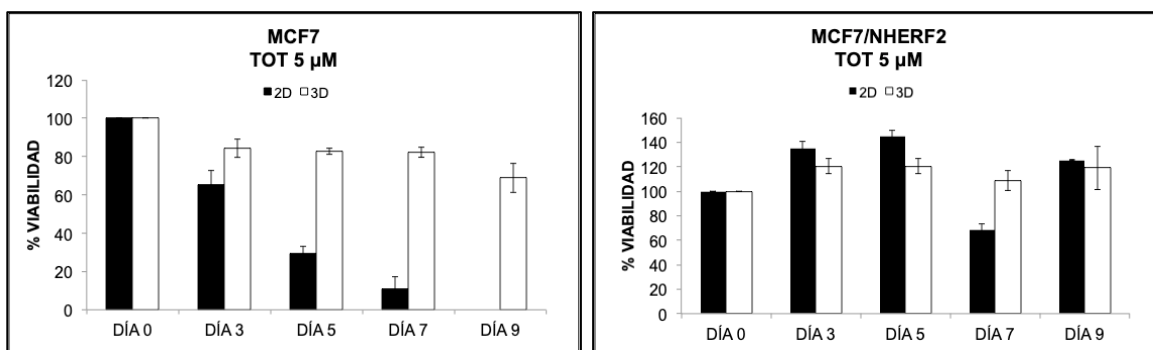


Figura 13. Viabilidad en presencia de Tamoxifeno. Comparación entre el modelo en monocapa y el modelo tridimensional en células MCF7 y MCF7/NHERF2 a una concentración de a) TOT 1μM y b) TOT 5 μM

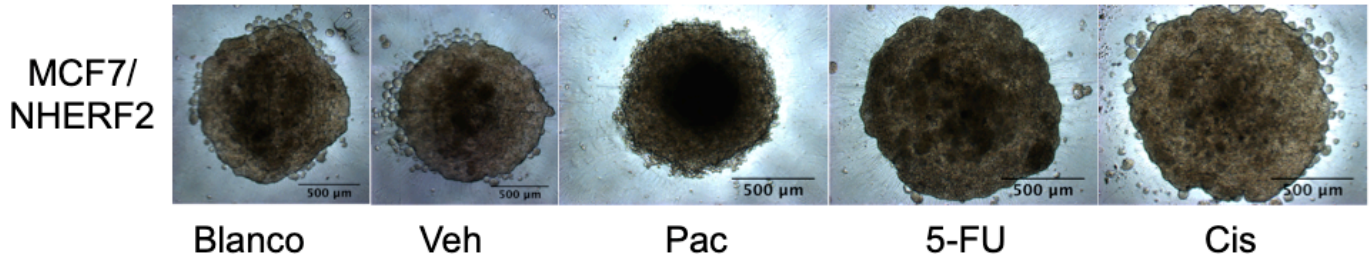
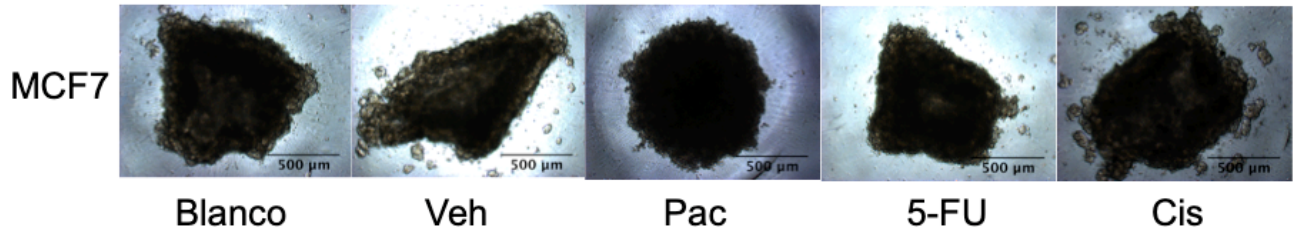
6. Sensibilidad tumoral en presencia de agentes quimioterapéuticos

Para explorar la posibilidad de que también la estructura del esferoide y la expresión de NHERF2 en células MCF7 protejan a la célula contra la exposición a fármacos utilizados en la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama, los esferoides se incubaron por un periodo de nueve días con paclitaxel 100 nM, 5-FU 10 μM y cisplatino 10 μM y se midió su viabilidad a partir del tercer día y posteriormente cada 48 h teniendo como referencia que el 100 % fueron los esferoides en medio DMEM con SFBt 5 % y en comparación con el vehículo.

6.1. Esferoides en presencia a diferentes agentes quimioterapéuticos

Después de 3 días de tratamiento las células MCF7 comenzaron a mostrar señales de deterioro en su estructura en presencia de 5-FU y cisplatino (Fig. 14 y Tabla 4). Los esferoides formados por células NHERF2 nuevamente mostraron una estructura definida de bordes lisos que no fue significativamente afectada por la presencia de los quimioterapéuticos. A los 9 días de tratamiento los esferoides de células MCF7 mostraron un claro deterioro en su estructura. Los esferoides de MCF7/NHERF2 mostraron también un deterioro en presencia de 5-FU y cisplatino de manera que también se vio disminuida el área de los esferoides y la compactación de estos esferoides fue mas notoria.

Tratamiento. Quimioterapéuticos
Día 3



Tratamiento. Quimioterapéuticos
Día 9

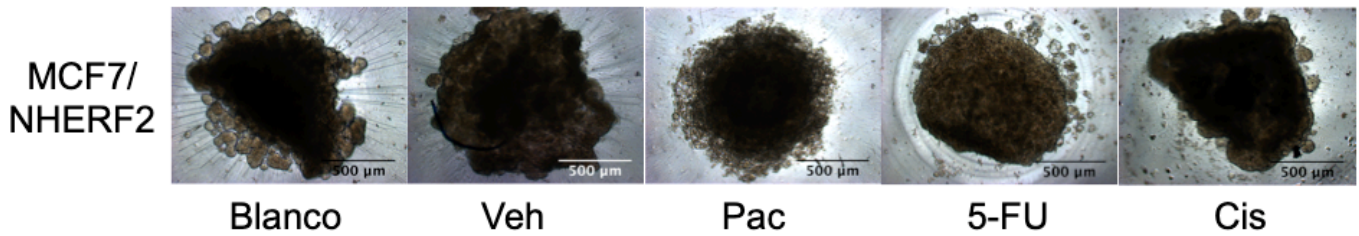
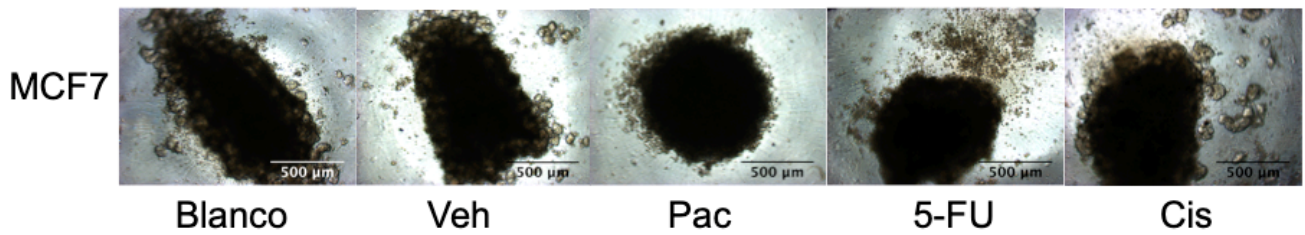


Figura 14. Cultivos 3D en presencia de quimioterapéuticos. Fotografías de los esferoides al tercer y noveno día de tratamiento de quimioterapéuticos.

Tabla 4. Medidas de los esferoides ante la presencia de quimioterapéuticos

Línea celular	Quimioterapéutico	Día	Área (mm ²)
MCF7	Paclitaxel (100 nM)	3	772.3
		9	632.5
	5-FU (10 mM)	3	674.6
		9	540
	Cisplatino (10 mM)	3	884.2
		9	683.0
MCF7/ NHERF2	Paclitaxel (100 nM)	3	603.7
		9	447.3
	5-FU (10 mM)	3	1080.8
		9	738.6
	Cisplatino (10 mM)	3	1121.1
		9	799.3

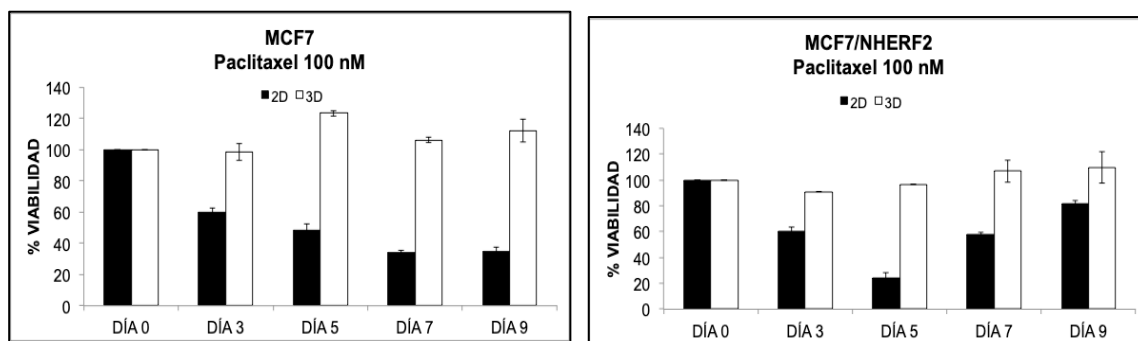
6.2. Efecto de la viabilidad celular ante la presencia de agentes quimioterapéuticos entre las líneas celulares MCF7 y MCF7/NHERF2 en un modelo bidimensional y tridimensional

Los resultados sugieren que el efecto observado en NHERF2 es específico para TOT y no se extiende a los quimioterapéuticos, sin embargo entre los 3 fármacos utilizados, 5-FU puede ser prometedor para afectar la viabilidad en las células sobreexpresantes de NHERF2.

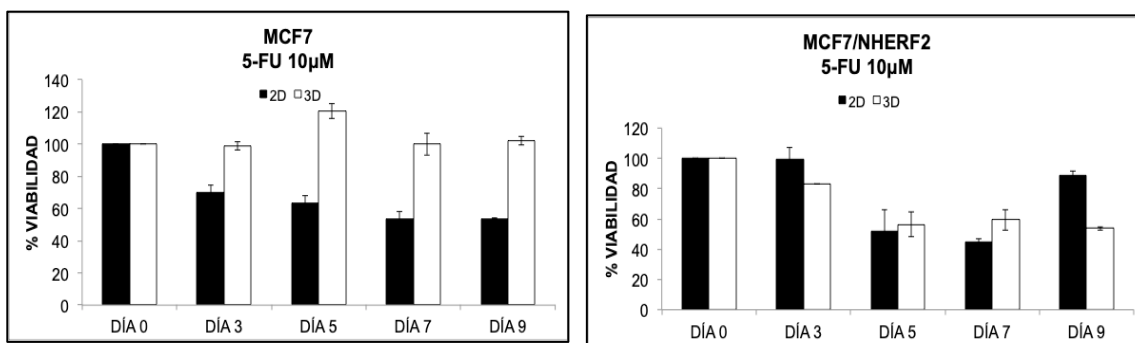
En una comparación entre los modelos utilizados con los distintos tratamientos en los que estuvieron expuestas las células control y las MCF7/NHERF2 (Fig. 15): A) paclitaxel en las células MCF7 muestran diferencia significativa al igual que las células MCF7/NHERF2 en cuanto a su viabilidad, siendo las células 2D más sensibles al tratamiento con paclitaxel que las control. B) Cuando se analizó el efecto del 5-FU solo las células parentales MCF7 presentaron una diferencia significativa en su viabilidad entre el modelo en monocapa y el modelo 3D mientras que las células NHERF2 es independiente del modelo celular usado, puesto que si mostró una disminución de la viabilidad por debajo del 60 %, siendo este el único fármaco capaz de disminuir la viabilidad en estas células. Para el caso de C) cisplatino las células control no presentaron diferencia significativa entre modelos, pero si en la viabilidad entre días, esto en el día 3 a 5 y 7 en

monocapa. En el otro caso, la viabilidad de las sobreexpresantes si se ve diferenciada con respecto al modelo utilizado. Los resultados fueron analizados por una ANOVA multifactorial al igual que en los ensayos anteriores y la prueba de Tukey para el contraste múltiple de rangos.

A)



B)



C)

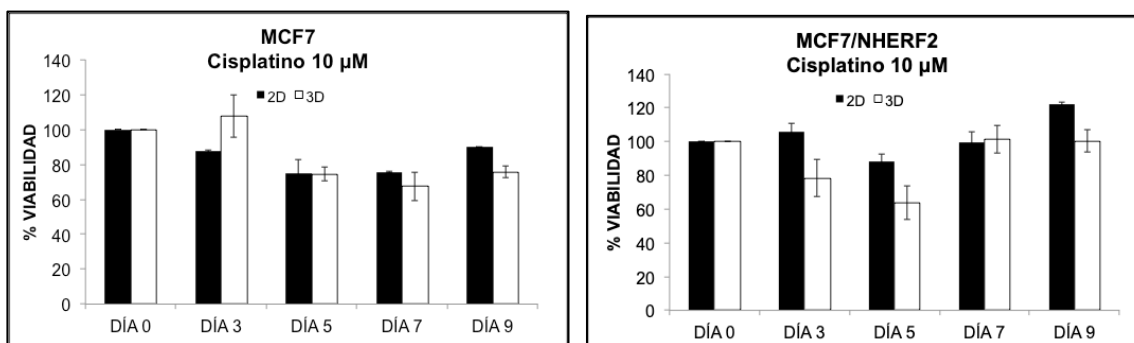


Figura 15. Viabilidad en presencia de paclitaxel, 5-FU y cisplatino. Comparación entre el modelo 2D y 3D

7. Análisis de supervivencia promedio en la expresión de NHERF2 de pacientes con cáncer de mama ER positivo

Finalmente, se realizó un análisis bioestadístico con la plataforma de GOBO para la presentación de una gráfica Kaplan Meier sobre el porcentaje de supervivencia en pacientes de cáncer de mama cuando estas tienen un perfil alto o bajo en la expresión de NHERF2.

7.1. Gráfica Kaplan Meier

La supervivencia promedio mostrada en la Fig. 16 cuando las pacientes presentan una alta expresión de la proteína NHERF2 es estadísticamente significativa menor a diferencia de tener una baja expresión del coactivador.

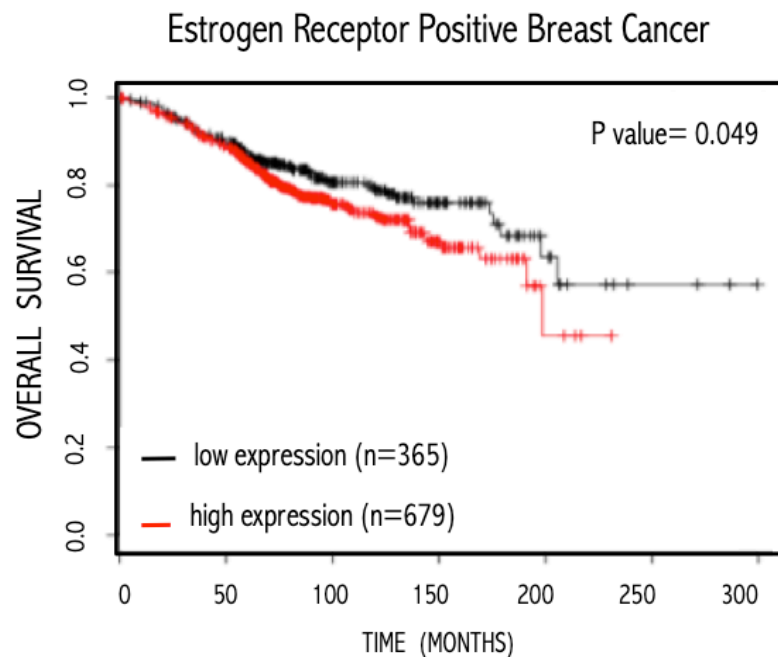


Figura 16. Gráfica Kaplan Meier. Supervivencia promedio en la expresión de NHERF2 en pacientes cáncer de mama RE positivo (Plataforma GOBO)

Después de los 5 años, la supervivencia es menor para las mujeres que tienen una alta expresión en el coactivador NHERF2, volviéndose mas notorio conforme pasan los años

DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo por objetivo el desarrollar un sistema de cultivo celular 3D (esferoides celulares) para estudiar la sensibilidad de células de cáncer de mama al E₂, antagonistas de estrógenos como tamoxifeno y a fármacos utilizados en quimioterapia de pacientes con cáncer de mama y comparar la eficiencia de este sistema con el cultivo celular tradicional en monocapa (2D). Como modelo experimental se utilizaron a las células MCF7 como control y a las células MCF7/NHERF2 caracterizadas por la sobreexpresión del coactivador de receptores hormonales nucleares NHERF2. Las células MCF7 son caracterizadas por una tasa de proliferación moderada, baja capacidad de migración y potencial tumorigénico. En contraste las células MCF7/NHERF2 exhiben una elevada tasa de proliferación, migración y potencial tumorigénico.

El uso de NHERF2 en esta tesis se basa en el descubrimiento por nuestro laboratorio de que esta proteína funciona como coactivador del ER α . Nuestros resultados demostraron que células MCF7 que sobreexpresan a NHERF2 exhiben un aumento significativo en la activación transcripcional dependiente de ER α , y como resultado, un incremento en la proliferación celular y potencial de tumorigenicidad en un modelo de xenotransplante en ratones atímicos (Meneses-Morales, et al., 2014). Recientemente, la proteína NHERF2 ha sido asociada también a estadios avanzados de cáncer de colon (Yoshida, et al., 2016).

La combinación de todos estos resultados demuestra la relevancia de NHERF2 en el desarrollo de tumores de cáncer de mama. En esta tesis se propuso el uso del cultivo celular 3D para determinar el efecto de NHERF2 sobre la formación de esferoides, viabilidad celular y respuesta a estradiol, tamoxifeno y a diferentes compuestos utilizados en el tratamiento por quimioterapia de pacientes afectados con cáncer de mama.

Se utilizó el colorante azul resazurina no fluorescente para determinar la viabilidad celular en esferoides de células de cáncer de mama. La reducción enzimática de este reactivo a resorufina rosa, un compuesto altamente fluorescente, es mediado por el metabolismo mitocondrial y se usa como un indicador de la viabilidad celular (Sonnaert, et al., 2015).

Los resultados demuestran que las células MCF7 y MCF7/NHERF2 son capaces de formar esferoides después de 72 h de cultivo. Sin embargo, la estructura de los esferoides de células NHERF2 exhibió una mayor compactación y bordes más definidos que los esferoides de células MCF7 (Fig. 8). Además con el paso del tiempo los esferoides NHERF2 desarrollaron un centro libre de células que semeja el centro necrótico o hipóxico de tumores sólidos. Esta estructura no se desarrolló en esferoides de células control MCF7. Los esferoides de células MCF7 incubados hasta por un período de 5 días mantuvieron una estructura que se denomina esferoide disperso y que se caracteriza por una estructura menos compacta y bordes poco definidos (Imamura, et al. 2015).

Cuando los esferoides estuvieron en presencia de distintos tratamientos, ya fuera con tamoxifeno o en los quimioterapéuticos, su estructura o la conformación de estos para el día 9 se perdió o cambió (Zanoni, et al., 2016; Zhang, et al., 2016). En un monitoreo continuo, de las células MCF7 tratados con fármacos mostró que los esferoides se desintegraron o se inhibió su crecimiento (Thakuri, Ham & Tavana, 2016). En los esferoides MCF7/NHERF2 (Fig. 12 y 14) la pérdida de la estructura tridimensional no se presentó de manera drástica.

La unión del estradiol con el ER α promueve el reclutamiento de coactivadores al complejo receptor-ligando. Las consecuencias de este evento fomentan el empleo de otros factores de transcripción al complejo ER α -ligando (Huq, et al., 2018); la respuesta de las sobreexpresantes de NHERF2 ante este agonista fue mayor que en las células control, observándose una mayor viabilidad en el modelo 3D que en el modelo bidimensional. Sin embargo, a pesar de 9 días en presencia de E₂

ambas líneas y en ambos modelos presentaron una viabilidad por arriba del 80% (Fig. 11) lo cual era lo esperado pues como se mencionó, el estradiol promueve la viabilidad y la proliferación de las células al unirse con el ER y activar mecanismos de transcripción.

Los esferoides de células de cáncer de mama mostraron diferente sensibilidad al tamoxifeno en comparación a células MCF7 mantenidas en cultivos 2D. En distintos trabajos (Dhiman, Ray & Panda, 2005; Fan, et al., 2014; Thewes, et al., 2015; Zhu, et al., 2018), se utilizan concentraciones de tamoxifeno a partir de 1 μM , siendo ésta la concentración más utilizada para los ensayos de citotoxicidad. En nuestros ensayos decidimos utilizar concentraciones de 1 μM y 5 μM de tamoxifeno para estudiar el efecto de este compuesto sobre la viabilidad celular en esferoides de cáncer de mama.

Los cultivos en monocapa de células MCF7 control exhibieron después de 9 días de tratamiento una elevada sensibilidad a las dos concentraciones de tamoxifeno utilizadas, exhibiendo una reducción del 73 % y 89 % en la viabilidad celular en presencia de 1 μM y 5 μM , respectivamente. Los cultivos 3D de células MCF7 expuestas a tamoxifeno 5 μM mostraron una reducción de solo el 33 % (Fig. 13). Estos resultados sugieren que el arreglo de células de cáncer de mama en esferoides tiene un efecto protector intrínseco contra el tamoxifeno.

Como siguiente paso se comparó la viabilidad de cultivos 2D y esferoides de células MCF7/NHERF2 expuestos a tamoxifeno 5 μM . En estos experimentos la viabilidad celular de ambos tipos de cultivos se mantuvo por encima del 100% en comparación con los valores iniciales. Los resultados indican que NHERF2 confiere resistencia al tamoxifeno tanto a cultivos 2D como esferoides. Estos resultados confirman el efecto de NHERF2, que había sido previamente descrito por nuestro laboratorio, como coactivador del receptor de estrógenos y su impacto en el crecimiento de células de cáncer de mama y sensibilidad a tratamiento hormonal. Estos resultados también sugieren que el cultivo 3D permite observar

diferencias en adhesión celular, cambios en la formación y estructura de esferoides y sensibilidad al tratamiento con tamoxifeno que son resultado de cambios en la expresión de una sola proteína, en este caso del coactivador NHERF2. Es importante hacer notar que el efecto del tamoxifeno observado sobre la viabilidad celular de cultivos 2D y 3D de células MCF7 claramente indica que estos cultivos responden de manera diferencial al tratamiento. Es posible que la menor sensibilidad mostrada por cultivos 3D a tamoxifeno este relacionada con su similitud a la estructura de tumores sólidos cuya principal propiedad es la de limitar el acceso celular a los diferentes tratamientos (Lin & Chang, 2008).

A pesar de la alta eficacia del tamoxifeno como tratamiento endocrino para el control del crecimiento tumoral en cáncer de mama, un tercio de las pacientes presentan reincidencia tumoral o metástasis. En estos casos los tumores ya no responden a tratamiento con tamoxifeno y los pacientes requieren recibir quimioterapia (Zhu, et al., 2018).

Por lo anterior, como siguiente paso se determinó la especificidad de NHERF2 sobre la sensibilidad celular al tamoxifeno mediante ensayos de viabilidad celular de cultivos los 2D y 3D expuestos a paclitaxel, 5-FU y cisplatino, utilizados en el tratamiento quimioterapéutico de pacientes con cáncer de mama. El mecanismo de acción de estos compuestos varía enormemente. El paclitaxel impide la polimerización de microtúbulos en las células lo cual previene la división y proliferación celular (Khongkow, et al., 2013). El compuesto 5-FU compite con la dUMP (monofosfato de desoxiuridina) al unirse a la timidilato sintasa y así inhibir la síntesis de DNA (Focaccetti, et al., 2015). El cisplatino se une a la guanina y adenina formando aductos y alterando entonces la estructura del DNA (Zaki, Arjmand & Tabassum, 2016).

Como se esperaba los tres compuestos redujeron significativamente la viabilidad de cultivos 2D de células control MCF7, siendo el paclitaxel el compuesto con el que se observó una mayor reducción de la viabilidad celular. A los tres días de

tratamiento con paclitaxel los cultivos 2D de células MCF7 exhibieron una reducción del 59.7 % en la viabilidad. Estos resultados se comparan favorablemente con los de estudios previos que reportan que el paclitaxel reduce la viabilidad de cultivos 2D en 40 % después de 48 o 72 h de tratamiento (Fonseca, et al., 2016; Khongkow, et al., 2013). La incubación por 9 días de células MCF7 en monocapa en presencia de 5-FU y cisplatino resultó en una disminución de la viabilidad de 47 % y 10 %, respectivamente (Fig. 15).

Los cultivos 3D de células MCF7 nuevamente mostraron una resistencia intrínseca al tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Únicamente el tratamiento con cisplatino redujo la viabilidad 24.44 %, mientras que el tratamiento con paclitaxel y 5-FU no tuvo un efecto significativo durante los 9 días de tratamiento. Esta observación podría ser el resultado de que las concentraciones de paclitaxel y 5-FU utilizadas por este estudio se basaron en las concentraciones utilizadas en cultivos 2D. Es posible que los esferoides requieran de concentraciones mayores para observar un efecto citotóxico.

Los cultivos 2D de células MCF7/NHERF2 mostraron una sensibilidad diferente a compuestos quimioterapéuticos. El uso de paclitaxel y el 5-FU redujo significativamente la viabilidad celular después de 3 días de tratamiento. Sin embargo al final del experimento en el día 9 las células comenzaron a recuperarse mostrando una viabilidad del 82% y 88.50% para paclitaxel y el 5-FU respectivamente con respecto a los niveles iniciales. El tratamiento con cisplatino en el modelo 2D no tuvo un efecto aparente sobre la viabilidad de células MCF7/NHERF2. En cambio los esferoides de células MCF7/NHERF2 no fueron afectados en absoluto por el tratamiento con paclitaxel y cisplatino. La incubación con 5-FU redujo la viabilidad de los esferoides MCF7/NHERF2 un 53.80 % en el día 9 de tratamiento, siendo el único fármaco en afectar la viabilidad de células NHERF2.

Estos resultados indican que la expresión de NHERFF2 afecta la sensibilidad de células MCF7 a compuestos quimioterapéuticos. Aunque por el momento el mecanismo responsable es desconocido, es posible que el aumento en la actividad del ER α ocasionado por la sobreexpresión de NHERF2 resulte en la activación transcripcional de genes involucrados en los mecanismos de reparación del DNA e inhibición de apoptosis, procesos que son regulados por la actividad transcripcional del ER α . La sensibilidad diferencial de cultivos 3D a la presencia de tamoxifeno y agentes quimioterapéuticos sugieren la posibilidad de explorar el uso de este modelo celular como herramienta para la selección de fármaco y determinación de dosis terapéuticas que deberán ser utilizadas en el tratamiento de pacientes con tumores de cáncer de mama.

Los resultados obtenidos en este trabajo que sugieren que el tamoxifeno tiene un efecto limitado sobre la viabilidad de esferoides de células MCF7/NHERF2 podría tener implicaciones clínicas importantes. Estudios bionfórmáticos demuestran que pacientes con tumores de cáncer de mama con expresión elevada de NHERF2 muestran una mayor reincidencia tumoral y menor supervivencia a la enfermedad (Fig. 16). Estos resultados sugieren el uso de los niveles de expresión tumoral de NHERF2 como un posible marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En resumen, los resultados demuestran que las células de cáncer de mama arregladas en una estructura 3D (esferoides) exhiben propiedades diferentes a la de cultivos 2D que incluyen mayor viabilidad celular y una aparente diferenciación estructural que parece simular las condiciones que a las que las células se encuentran en una ambiente tumoral. Esto es importante debido a que actualmente los estudios farmacológicos y toxicológicos de nuevos tratamientos para el control de tumores de cáncer de mama se llevan a cabo principalmente en cultivos en monocapa. Es posible que las concentraciones arrojadas por estos estudios sean menores que las necesarias para desencadenar un efecto apoptótico en tumores.

Los esferoides de células MCF7 mostraron mayores umbrales de resistencia a tamoxifeno y agentes quimioterapéuticos que los cultivos 2D, mientras que la sobreexpresión de NHERF2 les confiere una mayor capacidad para formar esferoides y una mayor resistencia al tamoxifeno, cisplatino y paclitaxel. Cabe resaltar que estos resultados parecen confirmar la relevancia de la expresión de NHERF2 en el desarrollo tumoral, respuesta a tratamiento hormonal y pronóstico de sobrevivencia de pacientes con cáncer de mama ER+.

Como continuidad de estos resultados, se propone realizar ensayos de migración e invasión en cultivos celulares tridimensionales. Esta propuesta se basa en resultados anteriores donde si bien, las células parentales MCF7 no muestran una capacidad significativa para proliferar y migrar, sin embargo la sobreexpresión de NHERF2 puede conferirle a estas células un fenotipo mas agresivo e invasivo que es necesario documentar.

De igual manera, el desarrollo de un sistema de cultivo que posee propiedades semejantes a las de tumores sólidos presenta un oportunidad para estudiar nuevos esquemas de tratamiento para cáncer de mama luminal A y para la identificación de nuevos marcadores nucleares y membranales útiles en el diagnóstico y selección de tratamiento.

Finalmente, se esta considerando el uso de esferoides para la aplicación de técnicas genómicas, entre las cuales se encuentra el análisis de cambios en la estructura de la cromatina y de formación de dominios cromosómicos así como el estudio de la regulación de la actividad de promotores mediante las técnicas de CHIP-seq y ATAC-seq. Aunque ambas técnicas se han utilizado previamente en células de cáncer de mama en cultivo 2D, los resultados sugieren la posibilidad de que los patrones de expresión genética en cultivos 3D sean diferentes a los cultivos en monocapa. Si esto es cierto el uso de cultivos 3D podría llevar a la identificación de nuevos marcadores tumorales y posibles blancos terapéuticos.

CONTRIBUCIÓN

La implementación de un modelo *in vitro* el cual asemeja las condiciones que presentan los tumores y de esta manera ser utilizado como una herramienta para un diagnóstico más certero en respuesta a distintos tratamientos, utilizando como referencia la línea celular tumoral de cáncer de mama ER positivo MCF7 y la sobreexpresante del coactivador NHERF2 para medir la sensibilidad celular en presencia de los fármacos.

REFERENCIAS

1. Blanchette-Farra, N., Kita, D., Konstorum, A., Tesfay, L., Lemler, D., & Hegde, P. et al. (2018). Contribution of three-dimensional architecture and tumor-associated fibroblasts to hepcidin regulation in breast cancer. *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-018-0243-y
2. Breslin, S. and O'Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, 7(29).
3. Chang, M. (2012). Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Biomolecules And Therapeutics*, 20(3), 256-267. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.3.256
4. Comşa, S., Cîmpean, A., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 35(6), 3K17-3154
5. Darlington, A. (2015). Anatomy of the Breast. *Digital Mammography*, 3-10. doi: 10.1007/978-3-319-04831-4_1
6. Dhiman, H., Ray, A., & Panda, A. (2005). Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials*, 26(9), 979-986 doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.012
7. Fan, P., Agboke, F., Cunliffe, H., Ramos, P., & Jordan, V. (2014). A molecular model for the mechanism of acquired tamoxifen resistance in breast cancer. *European Journal Of Cancer*, 50(16), 2866-2876. doi: 10.1016/j.ejca.2014.08.011
8. Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., & Dallaglio, K. et al. (2015). Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLOS ONE*, 10(2), e0115686. doi: 10.1371/journal.pone.0115686
9. Fonseca, J., Marques, S., Silva, P., Brandão, P., Cidade, H., Pinto, M., & Bousbaa, H. (2016). Prenylated Chalcone 2 Acts as an Antimitotic Agent and

- Enhances the Chemosensitivity of Tumor Cells to Paclitaxel. *Molecules*, 21(8), 982. doi: 10.3390/molecules21080982
10. Holliday, D., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4). doi: 10.1186/bcr2889
 11. Hsia, E., Goodson, M., Zou, J., Privalsky, M., & Chen, H. (2010). Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(13), 1227-1237. doi: 10.1016/j.addr.2010.09.016
 12. Huq, A., Wai, L., Rullah, K., Mohd Aluwi, M., Stanslas, J., & Jamal, J. (2018). Oestrogenic activity of mimosine on MCF-7 breast cancer cell line through the ER α -mediated pathway. *Chemical Biology & Drug Design*. doi: 10.1111/cbdd.13404
 13. Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., & Toyoda, M. et al. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, 33(4), 1837-1843. doi: 10.3892/or.2015.3767
 14. Informed Health Online [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does chemotherapy work? 2012 Feb 9 [Updated 2016 Jan 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279427/>
 15. Johnston, S. R. D., & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nature Reviews Cancer*, 3, 821. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1211>
 16. Khongkow, M., Olmos, Y., Gong, C., Gomes, A., Monteiro, L., & Yagüe, E. et al. (2013). SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis*, 34(7), 1476-1486. doi: 10.1093/carcin/bgt098
 17. Liang, J., & Shang, Y. (2013). Estrogen and Cancer. *Annual Review Of Physiology*, 75(1), 225-240. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>

18. Lin, R., & Chang, H. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10), 1172-1184. doi: 10.1002/biot.200700228
19. Marieb, E., & Hoehn, K. (2008). *Human Anatomy and Physiology* (9th ed., pp. 561, 562). Pearson.
20. Meneses-Morales, I., Tecalco-Cruz, A., Barrios-Garcia, T., Gomez-Romero, V., Trujillo-Gonzalez, I., & Reyes-Carmona, S. et al. (2014). SIP1/NHERF2 enhances estrogen receptor alpha transactivation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 6885-6900. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku311>
21. Nanayakkara, A., Follit, C., Chen, G., Williams, N., Vogel, P., & Wise, J. (2018). Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-19325-x
22. Nelson, D., & Cox, M. (2015). *Lehninger Principles of biochemistry* (6th ed.). España: W.H. Freeman.
23. Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., & Nguyen, C. et al. (2003). Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BMC Cancer*, 3(1). doi: 10.1186/1471-2407-3-13
24. Paxton, S., Adele, & Peckham, M. (2018). The Leeds Histology Guide. Retrieved from https://www.histology.leeds.ac.uk/female/FRS_breast.php
25. Reynolds, D., Tevis, K., Blessing, W., Colson, Y., Zaman, M. and Grinstaff, M. (2017). Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. *Scientific Reports*, 7(1).
26. Serandour, A., Mohammed, H., Miremedi, A., Mulder, K., & Carroll, J. (2018). TRPS1 regulates oestrogen receptor binding and histone acetylation at enhancers. *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-018-0312-2
27. Sharma, N., et al., (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharmaceutic Technology Research*, 1(2)109-126.

28. Sonnaert, M., Papantoniou, I., Luyten, F., & Schrooten, J. (2015). Quantitative Validation of the Presto Blue™ Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(6), 519-529. doi: 10.1089/ten.tec.2014.0255
29. Sweeney, E., McDaniel, R., Maximov, P., Fan, P., & Jordan, V. (2012). Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations. *Hormone Molecular Biology And Clinical Investigation*, 9(2). doi: 10.1515/hmbci-2011-0004
30. Thakuri, P., Ham, S., & Tavana, H. (2016). Microprinted tumor spheroids enable anti-cancer drug screening. *2016 38Th Annual International Conference Of The IEEE Engineering In Medicine And Biology Society (EMBC)*. doi: 10.1109/embc.2016.7591647
31. Thewes, V., Simon, R., Schroeter, P., Schlotter, M., Anzeneder, T., & Buttner, R. et al. (2015). Reprogramming of the ERR and ER Target Gene Landscape Triggers Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Cancer Research*, 75(4), 720-731. doi: 10.1158/0008-5472.can-14-0652
32. Vuong, D., Simpson, P., Green, B., Cummings, M., & Lakhani, S. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465(1), 1-14. doi: 10.1007/s00428-014-1593-7
33. Wang, X., Wang, Y., Gu, J., Zhou, D., He, Z., Wang, X., & Ferrone, S. (2017). ADAM12-L confers acquired 5-fluorouracil resistance in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-10468-x
34. Wu, Y., Zhang, Z., Cenciarini, M., Proietti, C., Amasino, M., & Hong, T. et al. (2017). Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Is Regulated by the EZH2–ERα–GREB1 Transcriptional Axis. *Cancer Research*, 78(3), 671-684. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-1327
35. Yde, C., & Issinger, O. (2006). Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D1. *International Journal Of Oncology*. doi: 10.3892/ijo.29.6.1397
36. Yoshida, M., Zhao, L., Grigoryan, G., Shim, H., He, P., & Yun, C. (2016). Deletion of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 represses colon cancer

progress by suppression of Stat3 and CD24. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology*, 310(8), G586-G598. doi: 10.1152/ajpgi.00419.2015

37. Zaki, M., Arjmand, F., & Tabassum, S. (2016). Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action. *Inorganica Chimica Acta*, 444, 1-22. doi: 10.1016/j.ica.2016.01.006
38. Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., & Polico, R. et al. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6(1). <http://dx.doi.org/10.1038/srep19103>
39. Zhang, W., Li, C., Baguley, B., Zhou, F., Zhou, W., Shaw, J., Wang, Z., Wu, Z. and Liu, J. (2016). Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Analytical Biochemistry*, 515, pp.47-54.
40. Zheng, A., Kallio, A., & Härkönen, P. (2007). Tamoxifen-Induced Rapid Death of MCF-7 Breast Cancer Cells Is Mediated via Extracellularly Signal-Regulated Kinase Signaling and Can Be Abrogated by Estrogen. *Endocrinology*, 148(6), 2764-2777. doi: 10.1210/en.2006-1269
41. Zhu, Y., Liu, Y., Zhang, C., Chu, J., Wu, Y., & Li, Y. et al. (2018). Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-03951-0