



**“UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO”**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**“Estudio de la función de lncRNAs en los cambios transcripcionales y fenotípicos que conducen a la adquisición de un fenotipo más agresivo, en respuesta al microambiente de un esferoide multicelular tumoral”**

**TESIS DE DOCTORADO**

Que para optar por el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presenta:**

Alfredo García Venzor

**Tutor:** Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, Facultad de Medicina

**Comité Tutor:** Dr. Federico Ávila Moreno, Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Gonzalo Castillo Rojas, Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria, CDMX, noviembre 2019



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Vilma Maldonado quién gracias a su dirección, enseñanza y gran esfuerzo hizo posible para mí concluir mis estudios de doctorado. Agradezco mucho la paciencia que siempre demostró conmigo, permitiéndome equivocarme repetidamente sin censurarme por mi falta de experiencia. Esta falta de experiencia era sabiamente sopesada por la experiencia de la Dra. Vilma, que por sobre todo le permitía ser amable con todos. Le agradezco también ser una mujer fuerte que transmitió esa fortaleza a aquellos que a veces dejábamos de confiar. Gracias por haber sido una buena maestra para mí.

Al Dr. Jorge Meléndez que gracias a su mente brillante me enseñó muchas cosas, con sus comentarios y asesorías pudimos solventar problemas y siempre estuvo ahí para ayudarnos, aunque no fuéramos sus alumnos.

Al posgrado en Ciencias Biomédicas por su brindar su infraestructura académica en forma de cursos, congresos, simposios que permiten el crecimiento académico de nosotros, los estudiantes.

Al CONACyT (Número de becario 384857, Número de CVU 347666) que gracias a su programa de becas me permitió costear mi vida durante estos 5 años de estudios.

Al INMEGEN que gracias a sus instalaciones, infraestructura y personal científico muy capacitado brindó un ecosistema perfecto para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Gonzalo Castillo y al Dr. Federico Ávila, que gracias a sus observaciones, críticas y aportaciones ayudaron a enriquecer este proyecto y a mi crecimiento profesional.

A la Dra. Floria Lizarraga por toda su ayuda, por su enseñanza y por gentilmente haberse preocupado por mí. A la Dra. Cecilia Zampedri por su apoyo con los experimentos en el modelo de pez *Danio rerio*. Al Dr. Edgar Krötzsch y la M. en C. Rosa María Salgado por su apoyo en distintos experimentos del proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS**

Me gustaría que este trabajo, fuese un pequeño tributo a la ciencia. Una pequeña contribución a la gigantesca empresa humana de comprender su propia realidad. Que sirva para recordarme, cuando llegue a olvidarlo, que la ciencia permite acercarse a lo desconocido y maravillarnos, a la vez por nuestra gran ignorancia.

Dedico este logro de años de trabajo a mis padres, Alfredo y Arcelia, que, gracias a todo su amor, apoyo, enseñanza y la libertad que me han permitido experimentar han contribuido más que nadie a formar al hombre que soy. Por todo lo que han aportado a mi ser y que he aceptado agradecido, así como aquello que he decidido enfrentar con rebeldía, les agradezco todas las vivencias y enseñanzas con que han enriquecido mi vida.

Dedico, además, este trabajo a todos los amigos que me han acompañado a lo largo de distintos tramos de este andar. Siendo ellos, con su presencia, su cariño, compañía y sobre todo con su antagonismo, han sido siempre una fuente de misterio y esperanza en mi vida.

A ti espíritu libre, ungido en magia, que te escondes con el pudor del velo mismo. Te elevas entre soles con forma de flor.



INDICE	
INDICE .....	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
ABREVIATURAS.....	2
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
Cáncer de mama .....	2
Microambiente tumoral en cáncer de mama.....	3
Hipoxia y acidosis en el microambiente tumoral .....	5
La matriz extracelular en el microambiente tumoral.....	7
El componente celular del microambiente celular.....	7
Esferoides multicelulares tumorales .....	8
RNAs largos no codificantes y su función biológica. ....	16
Antecedentes históricos de la investigación en lncRNAs.....	16
Clasificación de los lncRNAs .....	20
Mecanismos de acción de los lncRNAs .....	22
lncRNAs en cáncer .....	24
lncRNAs y el microambiente tumoral.....	25
<b>CAPÍTULO II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>HIPOTESIS. ....</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
Estrategia experimental.....	29
Cultivo celular en monocapa.....	29
Cultivo de esferoides. ....	29
Silenciamiento del lncRNA-HAL mediante shRNAs. ....	30
PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) .....	30
Condiciones de hipoxia, acidosis y privación de suero. ....	30
Ensayos de citometría celular. ....	31
Separación por micro disección de las capas externas e internas de MCTS de MCF-7.....	31
Análisis de Transcriptoma completo por RNA-seq.....	31
Ensayos de TUNEL y Ciclo celular.....	32

Ensayos de migración y degradación de gelatina fluorescente.....	32
Ensayo de clonogenicidad en agar suave. ....	32
Ensayo de formación de mamoesferas.....	32
Expresión del lncRNA-HAL en muestras de cáncer de mama. ....	32
Ensayo de xenotrasplantes en peces Zebra.....	32
Ensayo de aislamiento de cromatina por purificación de RNA (ChIRP).....	33
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
Selección de lncRNA-HAL para su estudio. ....	34
Características de lncRNA-HAL.....	35
Evaluación de la expresión de lncRNA-HAL en esferoides de la línea MCF-7. ....	36
Efecto de la hipoxia y acidosis en la expresión de lncRNA-HAL.....	37
Evaluación de la expresión de lncRNA-HAL en las poblaciones de los esferoides. ....	41
Manipulación de la expresión de lncRNA-HAL. ....	44
Análisis del efecto de lncRNA en el perfil de expresión genética de la línea MCF-7. ....	45
Función de lncRNA-HAL en la proliferación de las células MCF-7. ....	51
Efecto de lncRNA-HAL en la migración y degradación de matriz extracelular .....	54
Efecto de lncRNA-HAL sobre la capacidad de supervivencia .....	56
Efecto de lncRNA-HAL sobre la población de células troncales tumorales de la línea MCF-7. .	59
Efecto de lncRNA sobre la tumorigenicidad In vivo .....	62
Análisis de la expresión de lncRNA-HAL en tumores de pacientes .....	64
Localización subcelular del transcrito de lncRNA-HAL .....	64
lncRNA-HAL interactúa directamente con proteínas nucleares .....	66
<b>CAPITULO V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS</b> .....	<b>78</b>
Apéndice 1. Secuencias y nombres de los oligonucleótidos usados en esta tesis. ....	98
Apéndice 2. Secuencias y nombres de las sondas de ChIRP usadas en esta tesis.....	99
Apéndice 3. Tablas con los resultados del experimento de RNA-seq. Se muestran aquellos genes cuya expresión cambió tras el silenciamiento de lncRNA-HAL.....	100
Apéndice 4. Artículo .....	104

## RESUMEN.

Los esferoides multicelulares tumorales (MCTS) constituyen un modelo *In vitro* que tiene la ventaja de incorporar distintos elementos microambientales presentes en los tumores *In vivo*, los cuales son difíciles de replicar en cultivos en monocapa. Dentro de los elementos microambientales que podemos destacar en los MCTS son: una disminución en la concentración parcial de oxígeno en las regiones internas de los esferoides, una disminución en el pH en esta región derivado del metabolismo anaeróbico, gradientes en las concentraciones de nutrientes y factores de crecimiento debido a su difusión al interior del MCTS, cambios en las uniones intercelulares y en la secreción de matriz extracelular, así como una heterogeneidad proliferativa caracterizada por la aparición de poblaciones quiescentes, apo-necróticas y proliferativas. La presencia de este microambiente complejo trae consigo una la adquisición de rasgos fenotípicos de mayor agresividad por las células cancerosas, como un incremento en la proporción de la población de células troncales tumorales (CSC), una mayor capacidad migratoria e invasiva y resistencia a fármacos antineoplásicos. Previamente, nuestro grupo reportó que MCTS de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, traía consigo un cambio en los niveles de expresión de una gran cantidad de RNAs largos no codificantes en comparación con un control en monocapa. Esto nos llevó a cuestionarnos si estas moléculas regulatorias podrían estar implicadas en la adquisición de distintos rasgos fenotípicos de mayor agresividad, en respuesta a este microambiente del MCTS. Para ello seleccionamos un lncRNA, lncRNA-HAL, el cual es un transcrito no codificante que se localiza en el primer intrón del gen MNT (Max Network transcriptional repressor). Mediante ensayos de hipoxia, acidosis e inhibición farmacológica de HIF-1 $\alpha$  demostramos que lncRNA-HAL es un transcrito principalmente inducido por la hipoxia y regulado parcialmente por el factor de transcripción HIF-1. Mediante la separación de las distintas poblaciones del esferoide (quiescentes de proliferativas, células troncales y no troncales) observamos que lncRNA-HAL se expresa principalmente en las células no-proliferativas, con fenotipo troncal y que se localizan en las regiones internas hipóxicas del esferoide. El análisis del cambio en el perfil transcripcional de las células MCF-7 al silenciar lncRNA-HAL usando siRNAs, mostró que lncRNA-HAL podría regular la proliferación, la migración y la supervivencia en condiciones de estrés de la línea MCF-7. Análisis mediante curvas de crecimiento y perfiles de ciclo celular de las células silenciadas para lncRNA-HAL mostró que este transcrito podría inducir un fenotipo quiescente. Interesantemente el silenciamiento de lncRNA-HAL también causó una disminución en la población de células troncales tumorales, la expresión de marcadores de troncalidad, y la capacidad de crecimiento clonogénico. Sugiere que lncRNA-HAL podría regular la adquisición o mantenimiento de un fenotipo de célula troncal proliferativamente quiescente. Con el fin de determinar el posible mecanismo de lncRNA-HAL, analizamos su localización subcelular, se encontró que se encuentra enriquecido en la fracción nuclear, y su localización parece no estar regulada por cambios en el microambiente. Además, mediante un ensayo de ChIRP observamos que lncRNA-HAL interactúa principalmente con histonas (H1.1 y H2B) sugiere una interacción con cromatina, así como con hnRNP's (hnRNPU, hnRNPD y hnRNPA3) y RNA helicasas de la familia DDX (DDX5/17). Previamente ha sido descrita que la interacción de distintos lncRNA con estas hnRNP's y DDX5/17 permite la regulación a nivel transcripcional y de la estabilidad del mRNA de distintos genes blanco. En este estudio se analizó por primera vez la función de lncRNA-HAL en la adquisición de un fenotipo tumoral altamente tumorigénico como resultado de la hipoxia que se presenta en el microambiente de un cultivo tridimensional.

## ABSTRACT

Multicellular tumor spheroids (MCTS) is an *In vitro* Cell culture model which incorporates different microenvironment cues present in *In vivo* tumors and usually absent in monolayer cultures. This microenvironmental cues developed in MCTS are: A diminished oxygen perfusión in the inner regions of spheroids, a pH decrease due to anaerobic metabolism, concentration gradients of nutrients and growth factors, changes in intercellular unions and in extracellular matrix composition, as well as a proliferative heterogeneity distinguished by the appearance of quiescent, apo-necrotic and proliferative populations. This complex microenvironment allows the acquisition of more aggressive phenotypic traits by tumor cells, like an increase in cancer stem cells (CSC) populations proportion, a higher migratory and invasive phenotype and antitumoral drug resistance. Previously, our group found that MCTS culture of MCF-7 breast cancer cells caused an important change in the expression levels of several long non-coding RNAs (lncRNAs), compared with a monolayer control. With these findings in mind, we wondered if this novel regulatory molecule could be implicated in the acquisition of these aggressive phenotypic traits, in response to MCTS microenvironmental cues. We selected lncRNA-HAL, which is a non-coding transcript located in the first intrón of the MNT gene (Max Network transcriptional repressor). We found that lncRNA-HAL is mainly induced by hypoxia, but not by acidosis, partially regulated by HIF-1. The separation of the different regions and cell populations of MCTS showed that this gene is expressed mainly in the non-proliferative populations, with stem cell phenotype and located in the inner regions of spheroids. The silencing of lncRNA-HAL using shRNAs showed that this transcript regulates the expression of several genes, implicated in the regulation of proliferation, migration, and survival under stress in MCF-7 cells. The results obtained showed that lncRNA-HAL could be regulating the acquisition or maintenance of a quiescent phenotype. Also, lncRNA-HAL silencing causes important decrease in the proportion of CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> CSC population, accompanied by a decrease in clonogenic growth and expression of stemness markers. This suggests that lncRNA-HAL could be regulating the acquisition or maintenance of a quiescent CSC phenotype. In order to propose a possible mechanism for lncRNA-HAL, we evaluated its intracellular localization, finding a nuclear localization for this transcript. Finally, using a ChIRP assay we found that lncRNA-HAL interacts with different proteins; Histones (H1.1 and H2B) suggesting an interaction with chromatin, hnRNP's (hnRNPU, hnRNPD, and hnRNPA3) and RNA helicases of DDX family (DDX5/DDX17). The interaction of these proteins with different lncRNAs has been described previously, and it has been found that it allows the transcriptional regulation or mRNA stability regulation of several target genes. In this study, we studied for the first time, lncRNA-HAL function in the acquisition of a tumoral phenotype highly tumorigenic as a result of hypoxic stimulus present in MCTS microenvironment.

## ABREVIATURAS

**ncRNAs.** RNAs no codificantes

**lncRNAs.** RNAs largos no codificantes

**lncRNA-HAL.** lncRNA activado por hipoxia

**CSC.** Célula troncal tumoral

**HIF.** Factor inducido por hipoxia

**TNBC.** Cáncer de mama triple negativo

**hnRNP.** Ribonucleoproteína heterogénea nuclear

**DDX.** Helicasas de RNA con motivos dead box

**ChIRP.** Aislamiento de cromatina por purificación de RNA



## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

### Cáncer de mama

El cáncer, lejos de ser un padecimiento único constituye un grupo de más de 100 enfermedades diferentes, las cuales se caracterizan por una proliferación y diseminación descontrolada de las células de un tejido particular, es esta última la principal causa de muerte en pacientes con neoplasias. Las primeras descripciones médicas del cáncer como enfermedad provienen de los papiros conocidos como “Edwin Smith” y “George Ebers” provenientes de la cultura egipcia y que han sido datados del 1600 A.C. Posteriormente en Grecia, Hipócrates acuñó el término “Karkinoma” para denominar diversos tumores malignos, debido a su semejanza con la estructura de los cangrejos. Durante este periodo y hasta el siglo XVII se consideraba que el cáncer era un padecimiento resultante del exceso de bilis negra. En el siglo XVII el fisiólogo Gaspare Aselli descubrió los vasos linfáticos y sugirió que anomalías en los mismos eran la causa de la aparición de neoplasias, poniendo así fin a la teoría de que el cáncer era causado por cambios en los humores corporales. El desarrollo de nuevos microscopios durante el siglo XIX permitió la visualización de las células y de las funciones celulares. La incorporación de estas nuevas tecnologías al estudio del cáncer permitió la visualización de la célula cancerosa, y demostró que estas eran diferentes en apariencia a las células normales del mismo tejido. Durante inicios del siglo XX se realizaron grandes avances en la comprensión de aspectos estructurales y químicos de la biología celular. Así mismo el desarrollo de cultivos *In vitro* de células cancerosas permitió la evaluación de fármacos antitumorales *In vitro* y la evaluación de compuestos carcinogénicos. En 1911 se describió un retrovirus como la causa de cáncer en pollos, mientras se continuaba con la identificación de carcinógenos físicos y químicos.

A partir de estos avances durante el siglo XX se logró identificar al cáncer como una enfermedad de origen multifactorial, en la cual influyen aspectos genéticos, epigenéticos y ambientales, que tienen como consecuencia la alteración en la expresión y función de genes celulares que regulan proliferación, diferenciación, integridad genómica, y la muerte celular. Históricamente, se han diferenciado estos genes en dos grandes grupos: el de los oncogenes y el de los supresores tumorales (1).

Los oncogenes se han definido como aquellos genes que al tener alteraciones en su secuencia o cambios en sus mecanismos regulatorios conducen a un rasgo oncogénico. Es decir, aquellos genes cuya función en la célula es inducir la proliferación de la célula, la supervivencia, un estado indiferenciado. Dentro de este grupo de genes podemos encontrar a proteínas como Src, H-Ras, K-Ras, c-myc, Fos, Abl, Jun entre muchos otros. La mayoría de los oncogenes identificados son proteínas que responden a estímulos externos y conducen al crecimiento, supervivencia, proliferación y dediferenciación de las células. En este grupo de genes frecuentemente se presentan cambios en su secuencia, como mutaciones activadoras, duplicaciones génicas y cambios epigenéticos o regulatorios que conducen a un incremento aberrante en su expresión.

En cambio, los genes supresores de tumor como su nombre lo indica son genes que codifican para moléculas funcionales que también son reguladoras de procesos como la proliferación, la diferenciación, la muerte celular y la integridad genómica. En este caso, a diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumor tienen una función negativa sobre estos procesos, es decir, que funcionan como frenos a la proliferación descontextualizada, inducen una identidad celular, en condiciones adecuadas inducen la muerte de las células dañadas y también censan y reparan los daños al DNA con el fin de mantener la integridad de la información genética. Dentro de

este grupo podemos encontrar a genes como Rb, p53, Bad, APC, BRCA2, entre muchos otros. En los genes supresores de tumor se han descrito cambios en su secuencia como mutaciones inactivantes o sin sentido, deleciones completas, o bien cambios en su regulación transcripcional que conducen a su represión, tal como la metilación de las islas CpG en los promotores de estos genes (2).

Los tumores se han clasificado en dos grandes grupos: los tumores líquidos y los tumores sólidos. En el primer grupo se agrupan todas las neoplasias hematológicas, mientras en el segundo grupo se agrupan los tumores derivados de epitelios (carcinomas) y mesénquima (sarcomas), los cuales finalmente son a los que nos referimos con el término de cáncer. La gran mayoría de los tumores sólidos son derivados de los distintos epitelios del cuerpo, como el epitelio alveolar, el epitelio del colon, el epitelio gástrico, el epitelio pancreático, el epitelio hepático (3).

El cáncer de mama es un tumor sólido que se origina a partir de las células epiteliales de los ductos mamarios y de los lóbulos mamarios. El cáncer de mama es la principal neoplasia en la población femenina a nivel mundial, y el segundo cáncer con mayor incidencia en toda la población del mundo. En el 2012 se estimó que el cáncer de mama presentó un incremento de 1.6 millones de nuevos casos, colocándose como el tumor más frecuente en poblaciones femeninas tanto de regiones desarrolladas (794,000 casos totales) como en desarrollo (883,000 casos totales). Además, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina de países en desarrollo (324,000 muertes en el 2012) y la segunda causa de muerte en países desarrollados (198,000 muertes en el 2012) después del cáncer de pulmón (4, 5). En México el cáncer de mama desplazó al cáncer cervicouterino como la principal causa de muerte por neoplasias en la población femenina desde el 2006. Anualmente, en México se estima una incidencia de 35.4 nuevos casos por cada 100,000 mujeres. En el año 2013 se registraron 5,405 defunciones, observándose una tasa de defunciones de 16.3 por cada 100,000 mujeres (6).

El tratamiento contra el cáncer de mama generalmente incluye la remoción quirúrgica con el fin de extirpar el tumor, seguida de un esquema de tratamiento localizado con radiación o bien el tratamiento sistémico farmacológico, que puede ser de terapia hormonal o bien de quimioterapia (7). Sin embargo, la estrategia clínica que ha obtenido mejores resultados en el tratamiento del cáncer de mama es la detección temprana de dicha enfermedad, que permite iniciar el tratamiento durante etapas iniciales del cáncer, justo cuando el tratamiento puede tener un efecto curativo sobre la enfermedad. La mastografía se ha convertido en el sistema diagnóstico por excelencia, ya que ha logrado disminuir la mortalidad por cáncer de mama en un 29-30% de la población tamizada (8). Sin embargo, la cobertura de dicho sistema de tamizaje ha sido limitada en México, donde se estima que cerca del 15% de la población femenil tiene acceso a este sistema de diagnóstico, lo que da como resultado que el 70% de los diagnósticos de cáncer de mama ya son tumores localmente avanzados en los que el tratamiento tiene un efecto limitado. Es por este motivo que el cáncer de mama en México constituye un grave problema de salud pública (9).

### **Microambiente tumoral en cáncer de mama**

Todas las células de los tejidos de un organismo multicelular se encuentran rodeadas e interactúan con el microambiente tisular. Este microambiente se conforma por las señales hormonales y de moléculas de señalización presentes en los espacios extracelulares, la matriz extracelular con su composición y su estructura mecánica, la membrana basal de los epitelios, las concentraciones de nutrientes como oxígeno, glucosa, aminoácidos, y las células estromales y del sistema inmune como fibroblastos, adipocitos, endoteliales, macrófagos, linfocitos y células dendríticas. En el caso del epitelio mamario, este no entra en contacto directo con la lámina basal y el estroma, ya que este epitelio se encuentra rodeado por una capa de células conocidas como células mioepiteliales, las

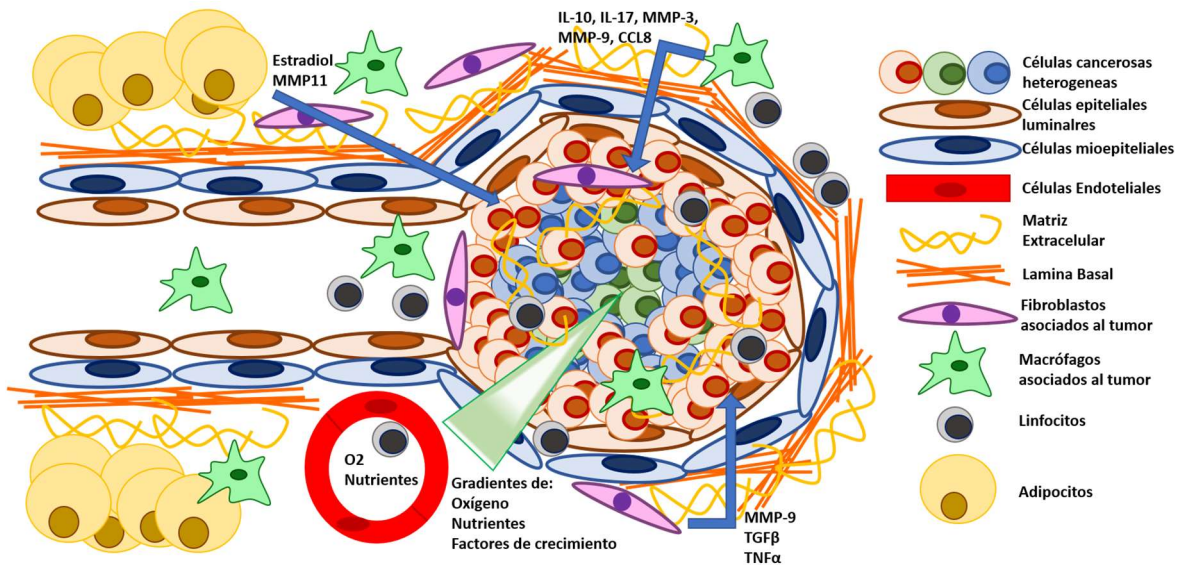
cuales median la interacción entre el epitelio y su microambiente. El microambiente del tejido mamario es sumamente importante para la morfogénesis, desarrollo y funcionamiento correcto del tejido (10).

Diversos estudios han demostrado que el microambiente del tejido mamario es un elemento importante para limitar el fenotipo tumorigénico de células transformadas. Se ha observado que las células mioepiteliales pueden mantener un microambiente restrictivo para la diseminación de células invasivas, por su función en la deposición de la lámina basal. Así mismo, las células mioepiteliales pueden ejercer un efecto antiproliferativo gracias a la secreción de TGF- $\beta$  y de diversos inhibidores de proteasas como TIMP-1, Nexin-II, Alfa-1 antitripsina, neogenina y MEPI (11, 12). La matriz extracelular también es un ejemplo de un componente del microambiente que puede ser restrictivo para el fenotipo tumorigénico. Se ha demostrado que el cultivo de células epiteliales de mama en una matriz extracelular rica en laminina conduce a un arresto en la proliferación celular, y una diferenciación en estructuras polarizadas parecidas a alveolos mamarios (13).

Los tumores mamarios no sólo están compuestos por células tumorales, sino que también están compuestos por una gran variedad de componentes microambientales que regulan el proceso de progresión tumoral. Además, al igual que la célula cancerosa, el microambiente tumoral cambia conforme la enfermedad avanza y se diferencia del microambiente del tejido normal. Esto genera una transición de un microambiente normal que brinda las señales necesarias para el correcto funcionamiento de la célula, a un microambiente tumoral que se vuelve permisivo y promotor del desarrollo de las células tumorales. En este sentido, un buen ejemplo que puede plasmar esta idea es la aparición de regiones de hipoxia en los tumores. El crecimiento de los tumores trae consigo que la perfusión sanguínea sea insuficiente para mantener niveles de oxígeno normales en ciertas regiones del tumor, lo que causa que las células pasen a condiciones de hipoxia. La hipoxia en el contexto de la célula cancerosa puede funcionar como una presión selectiva que permite la aparición y aumento de células con rasgos tumorigénico más agresivos, un fenotipo metastásico o bien un fenotipo semejante a una célula troncal.

Los componentes del microambiente tumoral se pueden agrupar de manera general en 3 grupos principales: 1) Componentes celulares como fibroblastos asociados a cáncer (CAF), adipocitos, células endoteliales, células mioepiteliales, macrófagos, linfocitos. 2) Los componentes de la matriz extracelular, constituida por todo el conjunto de proteínas de soporte, glucoproteínas y proteoglicanos. 3) Factores fisicoquímicos como concentraciones de metabolitos, factores de crecimiento, citocinas y nutrientes, gradientes de pH y oxígeno. En la figura 1 se esquematizan los principales componentes del microambiente tumoral en cáncer de mama.





**Figura 1. Microambiente tumoral del cáncer de mama.** Se muestran los principales componentes del microambiente tumoral descritos en este texto. Componentes fisicoquímicos como los gradientes de Oxígeno, pH y nutrientes; la matriz extracelular y su composición; Componentes celulares, como fibroblastos asociados al cáncer, células epiteliales luminales, células mioepiteliales, células endoteliales, macrófagos asociados al tumor, linfocitos y adipocitos.

### Hipoxia y acidosis en el microambiente tumoral

El crecimiento de la masa tumoral causa cambios en el microambiente tanto celular como fisicoquímico. La importancia del microambiente tumoral durante la carcinogénesis se ha descrito ampliamente (14). Dentro de los diferentes componentes del microambiente tumoral, uno de los más estudiados ha sido la concentración de  $O_2$  en los tumores. Algunos estudios han medido la presión parcial de  $O_2$  en tejidos sanos y en tumores, mostrando que todos los tumores presentaron bajos niveles de  $O_2$  (10mmHg) en comparación con el tejido mamario normal (aprox. 65mmHg). Esta disminución en la concentración de  $O_2$  se debe a que el crecimiento de la masa tumoral conduce a una mala perfusión de oxígeno en regiones distales al vaso. Además, los nuevos vasos formados son estructural y funcionalmente anormales. De este modo existen regiones en los tumores en los que la difusión de oxígeno y diversos nutrientes se ve fuertemente disminuida (15). La hipoxia causa una respuesta celular que esta mediada por cambios importantes en el programa transcripcional de la célula y que le permite adaptarse tanto fisiológica como metabólicamente a las bajas concentraciones de oxígeno. Este programa transcripcional se encuentra regulado principalmente por los factores de transcripción de la familia HIF (Hipoxia Inducible Factor), los cuales son dímeros constituidos por una subunidad sensible a oxígeno (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ) y una subunidad HIF-1 $\beta$  cuya expresión es constitutiva. En condiciones de normoxia la subunidad  $\alpha$  es continuamente degradada, debido a la unión con la proteína Von Hippel-Lindau (VHL) que recluta una ubiquitin ligasa. La interacción de VHL con HIF-1 $\alpha$  depende de la hidroxilación en residuos específicos de asparagina de HIF-1 $\alpha$  catalizado por la enzima Prolil Hidroxilasa 2 (PHD2). PHD2 utiliza oxígeno y  $\alpha$ -cetoglutarato como sustratos, por lo que la disminución en la concentración de oxígeno conduce a una disminución en la actividad de PHD2, lo que estabiliza a HIF-1 $\alpha$ (16). El incremento en la concentración de HIF-1 $\alpha$  le permite dimerizar con HIF-1 $\beta$ , translocarse al núcleo y activar la expresión de genes que contengan elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en sus promotores. La

hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  también impide la interacción de HIF-1 $\alpha$  con la proteína p300 y disminuye considerablemente su actividad transcripcional (17). La activación de HIF-1 trae consigo el incremento en la expresión de cientos de genes (se ha observado que HIF se une a los promotores del 40% de los genes responsivos a hipoxia) e inhibe la expresión de otros tantos, sin embargo se ha observado que el efecto de HIF sobre los genes que reprime y algunos de los que activa esta mediado indirectamente por la expresión de represores transcripcionales, factores de transcripción y microRNA's (18, 19). La adquisición del fenotipo hipóxico promueve el crecimiento tumoral, la formación de nuevos vasos sanguíneos, evasión del sistema inmune y el fenotipo metastásico (20-22).

La activación de los factores HIF trae consigo la expresión de genes que conducen a un incremento en el fenotipo maligno de las células tumorales, e impactan en una gran variedad de funciones celulares tales como: 1) transporte de oxígeno y metabolismo de hierro (ceruloplasmina, eritropoyetina, transferrina y el receptor de transferrina). 2) Angiogénesis (adrenomedulina, angiopoietina-2, ciclooxygenasa-2, FGF-3, HGF, NOS, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , VEGF-A y su receptor. 3) Glucolisis y metabolismo de glucosa (aldolasa A, enolasa, Glut-1, Glut-3, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, HK-1, HK-2, LDH-A, PFK-C, PFK-L y piruvato kinasa). 4) Factores de transcripción (anexina V, NIK, ciclina G2, DEC1, FOS, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , IGF binding protein, KIP1, lipocortina, NF-kB, NIP3, NIX, WAF1. 5) Metabolismo y resistencia a pH ácido (acetil coA thiolasa, adenilato kinasa 3, aminopeptidasa-A, Anhidrasa carbónica 9, fosforibosil pirofosfato sintasa, tirosina hidroxilasa. 6) Factores de crecimiento y citocinas (IGF-2, IL-6, IL-8, factor inhibidor de macrófagos, PDGF- $\beta$ , estaniocalcina). 7) Vías de respuesta a estrés (150-kDa ORP, GADD153, HAP-1, Tioredoxina). 8) Adhesión celular, matriz extracelular, citoesqueleto y proteasas (CD99, Colágena 5 $\alpha$ 1, Ku70, Ku80, MMP-9, MMP-13, Prolina-4 hidroxilasa, TF, receptor de urokinasa, vimentina,  $\alpha$ -integrina) (23).

El perfil transcripcional inducido por hipoxia tiene como finalidad permitir la supervivencia de las células mientras el estrés hipóxico se resuelve, sin embargo, la expresión, también por HIF, de proteínas apoptóticas como BNIP3 permiten a la célula entrar en apoptosis en el caso de que el estrés no se resuelva, o incluso se agrave. Este fenómeno ha generado diversas hipótesis que sugieren que la hipoxia podría ser una presión selectiva que además de inducir un fenotipo maligno más agresivo, también tiene la capacidad de seleccionar clonas resistentes a apoptosis, glucolíticas y con un fenotipo troncal, y por tanto ser un fenómeno de suma relevancia en el proceso de progresión tumoral (24).

La hipoxia puede jugar un papel importante en la generación y evolución del microambiente tumoral. Se ha demostrado que la hipoxia puede participar en el reclutamiento de células estromales, gracias a la secreción de quimiocinas como el factor de crecimiento placentario (PGF) y CXCL16, que reclutan a células troncales mesenquimales desde la médula ósea, así como la secreción de CSF-1 que recluta macrófagos (16, 25, 26). Además, el microambiente hipóxico impacta en la composición y propiedades mecánicas de la ECM, esto debido a la inducción de las enzimas lisil hidroxilasas que permiten el entrecruzamiento de las moléculas de colágeno tipo 1 (5, 27).

Otros componentes fisicoquímicos del microambiente tumoral que usualmente acompaña a la hipoxia es una disminución en el pH del tumor (acidosis). La acidosis usualmente es resultado de la producción glucolítica de ácido láctico debido al cambio hacia un metabolismo anaerobio (efecto Warburg). Usualmente el pH tumoral se encuentra en el orden de 6.5-6.9, y esta desviación del pH fisiológico es suficiente para inducir una fuerte presión selectiva sobre las poblaciones de células tumorales (28). El fenómeno de acidosis no ha sido tan ampliamente estudiado como la hipoxia, algunos reportes han demostrado el efecto de la acidosis sobre el desarrollo de cáncer de mama. Por ejemplo, un estímulo acidótico (pH 6.8) en varias líneas celulares de cáncer de mama es capaz de inhibir la interacción de la prolactina con su receptor y su posterior señalización con pSTAT5, afecta la invasión, la transición epitelio mesénquima (EMT) y la resistencia a fármacos

antineoplásicos (24, 29). Así mismo, ha sido descrito que la acidosis induce la adquisición de un fenotipo invasivo en células de cáncer de mama, en parte mediado por la activación acidótica de Akt (Serine/Threonin kinase 1), quien posteriormente induce la estabilización y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y la adquisición de un fenotipo metastásico (30). Además, se ha reportado que la acidosis puede inducir un microambiente inmunosupresor modula la función de los macrófagos asociados al tumor (31).

### **La matriz extracelular en el microambiente tumoral**

La matriz extracelular (ECM) es uno de los principales componentes del microambiente tumoral, y tiene repercusiones importantes en la adquisición de rasgos malignos, así como el crecimiento y desarrollo de tumores mamarios. Durante la progresión de los tumores mamarios, la matriz extracelular experimenta varios cambios, muchos de los cuales tienen características similares a aquellas observadas durante la involución de la glándula mamaria posterior a la lactancia (32). En cáncer de mama, se ha observado un incremento en rigidez de la matriz debido a un incremento en la deposición de proteínas fibróticas como colágeno tipo I, III y V, elastina, vitronectina, y fibronectina oncofetal, pero también una disminución en colágeno tipo IV y laminina-111. Este incremento en la rigidez puede incrementar la fuerza de tensión la cual conduce a un incremento en la agrupación de integrina y la activación de FAK (Focal Adhesion Kinase) lo que induce un incremento en la invasión mediada por PI3K (33). Hay también un incremento en la remodelación de la matriz extracelular derivado de la secreción de metaloproteasas (MMP), que liberan factores de crecimiento anclados a la ECM. El fenotipo invasivo en cáncer de mama usualmente se acompaña de la degradación de laminina-111, con el incremento concomitante en la producción de laminina-332 por los miofibroblastos. Este incremento de laminina-332 promueve la activación de la vía PI3K-Akt, además de un incremento en la migración e invasión vía Integrina  $\alpha$ 3 (34, 35). La Tenascina C (TNC), un componente de la ECM que usualmente se sobreexpresa durante la regeneración tisular, y se encuentra en muy bajos niveles en tejidos mamarios sanos, se sobreexpresa en cáncer de mama, especialmente en los frentes invasivos y, colocaliza en áreas de remodelación de la matriz e induce la producción de MMP-9 y MMP-13 (36).

### **El componente celular del microambiente celular**

El componente celular del microambiente celular es tan importante como la matriz extracelular y los elementos fisicoquímicos para el desarrollo y progresión de los tumores. Semejante a lo que ocurre en la glándula mamaria normal, uno de los tipos celulares más abundantes en el microambiente tumoral son los adipocitos. Mediante experimentos de cocultivos utilizando adipocitos y células de cáncer de mama, se demostró la activación de los adipocitos, induce un fenotipo secretor, acompañado de una disminución en la expresión de marcadores de adipocitos y la secreción de proteasas como MMP11 e IL-6, los cuales mostraron tener un rol en la adquisición de un fenotipo invasivo (37). Estos datos experimentales fueron confirmados posteriormente por inmunohistoquímica de tumores mamarios, observando que los adipocitos producen proteasas de ECM e IL-6 (37, 38). Otro estudio mostró que, en mujeres postmenopáusicas, el tejido adiposo sobreexpresa la aromatasa (P450Arom) lo que incrementa la producción de estrógenos (39). La adiponectina es otra hormona producida por el tejido adiposo que participa en la progresión del cáncer de mama (40).

Otro tipo celular relacionado con los adipocitos son las células troncales derivadas de tejido adiposo (ADSCs), que pueden diferenciarse en adipocitos, condrocitos y fibroblastos. Las ADSCs son atraídas por las células tumorales, y secretan citocinas como SCDF-1 (stromal Cell-Derived Factor 1), el cual actúa de manera paracrina para promover las capacidades migratorias, invasivas y metastásicas de las células de cáncer de mama (41). En un estudio pionero, la estimulación de ADSCs con exosomas derivados de las células tumorales, indujo la adquisición de un fenotipo semejante a miofibroblastos en las ADSCs, con la subsecuente producción de factores oncogénicos como SDF-1, VEGF, CCL5 y TGF- $\beta$  (42).

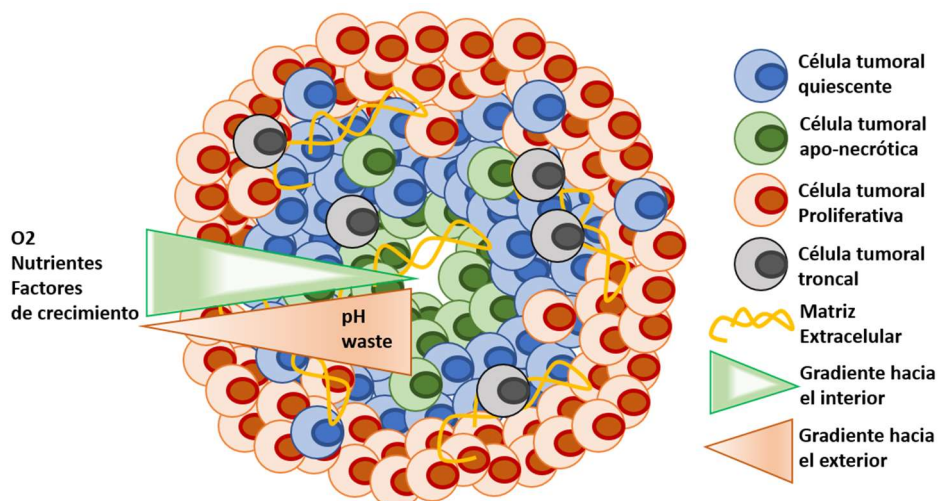
Los fibroblastos son comúnmente encontrados en el estroma del cáncer de mama. Los fibroblastos normales usualmente tienen bajas tasas proliferativas y metabólicas, y un fenotipo que suprime la progresión del tumor. Sin embargo, cuando los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) se activan, comienzan a proliferar, secretan grandes cantidades de componentes de la matriz y adquieren capacidades contráctiles y cambian hacia un fenotipo promotor del tumor (miofibroblastos) (43). Durante el cierre de heridas o la inflamación, la presencia de fibroblastos activos o miofibroblastos es transitoria, pero en cáncer es permanente. Se ha reportado que el perfil de expresión de fibroblastos normales y CAFs es muy diferente. Los CAFs muestran una supresión en la expresión de Fibulina-1, y un incremento en la expresión de Dickkopf-1, Neuregulina, PAI2 y uPA (44). Los CAFs promueven la progresión tumoral a través de diversos mecanismos, incluida la secreción de proteasas de remodelación de matriz como la MMP-9, la cual incrementa su capacidad invasiva (45). Además, los CAFs inducen la secreción de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en células de cáncer de mama, que a su vez inducen aún más la producción de MMP-9 por los CAFs (46). Los fibroblastos pueden también promover la angiogénesis tumoral a través de la secreción de SDF-1, que recluta a progenitores endoteliales hacia el tumor (47). Recientemente se ha demostrado que al igual que las células tumorales, los CAFs presentan un cambio metabólico hacia la glucólisis (efecto Warburg), y los metabolitos producidos son secretados y usados por las células tumorales con metabolismo aerobio para mantener su propio metabolismo (48). De las células del microambiente tumoral los CAFs son los más estudiados de todos, y su función durante el desarrollo de los tumores, parece ser necesario para la progresión del cáncer de mama.

Los macrófagos son parte de las células inmunes residentes del estroma de cada tejido y son una fracción prominente de las células en el microambiente de virtualmente todos los tumores. Hay dos clases principales de macrófagos funcionales, M1 y M2. Los macrófagos M1 responden a IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , y TLR4, y son capaces de activar linfocitos T citotóxicos y células NK, así como inducir una respuesta antitumoral. Los macrófagos M2 son células inmunomoduladoras que inducen la diferenciación de células T reguladoras e inhibe la respuesta antitumoral (49). El fenotipo M2 corresponde a la mayoría de los macrófagos asociados al tumor (TAM), los cuales secretan factores de crecimiento que promueven la angiogénesis, crecimiento, invasión, migración, metástasis e inmunosupresión en cáncer de mama (50). Los TAMs inducen la neovascularización, ya que secretan VEGF e inducen el reclutamiento de células endoteliales (51). Además, los TAMs producen IL-17, una citocina previamente asociada con autoinmunidad. La secreción de IL-17 incrementa la capacidad de invasión en matrigel de células de cáncer de mama, por un mecanismo independiente de MMP-2, MMP-3, MMP-9 y TNF- $\alpha$ . (29). Los TAMs pueden comunicarse a través de la secreción de exosomas, la activación de macrófagos por IL-4 induce la secreción de exosomas que contienen miRNAs, específicamente miR-223, los cuales llevan el mensaje a las células de cáncer de mama para promover invasión y migración a través de la vía Mef2C/ $\beta$ -Catenina (52). Los TAMs son componentes importantes del microambiente tumoral, y una de sus funciones principales es inducir un ambiente inmunosupresor que inhibe la respuesta inmune antitumoral.

## **Esferoides multicelulares tumorales**

Durante décadas el estudio del cáncer ha utilizado como modelo experimental líneas celulares tumorales crecidas en monocapa. Sin embargo, los cultivos en monocapa difieren considerablemente de las condiciones fisiológicas presentes en los tumores *In vivo*. Es el microambiente uno de los elementos que más difieren (53). Se sabe que una característica importante de los tumores es su organización espacial en tercera dimensión, y las uniones intercelulares que se derivan de esta organización. Este tipo de organización espacial está ausente en los modelos de cultivo en monocapa. Las microrregiones de hipoxia, y la acidosis resultante, que se observan comúnmente en los tumores también se encuentran ausentes. La matriz extracelular producida durante los cultivos en monocapa es muy pobre en comparación con la que se observa en los tumores *In vivo*. Sin mencionar la ausencia de otros tipos celulares como adipocitos, fibroblastos, macrófagos o células endoteliales. A pesar de estas limitaciones, ciertamente, los sistemas en cultivo en monocapa han permitido generar una gran cantidad de conocimiento respecto a la biología de los tumores (54).

En la década de los 80's, Sutherland y colaboradores diseñaron un sistema de cultivo *In vitro* que permite incorporar algunas de las características del microambiente tumoral a un modelo experimental *In vitro* (55, 56). A este sistema se le conoció como esferoides multicelulares tumorales (MCTS) dada la arquitectura que tomaban las colonias formadas, los MCTS son colonias esféricas formadas cuando se crecen ciertas líneas celulares en un sistema libre de anclaje, usualmente superficies recubiertas con agar o superficies no adherentes. El crecimiento en forma de esferoide permite el desarrollo de uniones intercelulares más complejas (57). Se ha observado que distintas moléculas de unión intercelular como E- y N- Cadherina, y  $\beta$ -integrina son importantes para la formación de la estructura tridimensional de los esferoides (58). Tanto E-Cadherina como N-Cadherina son indispensables para la formación de esferoides en las líneas MCF-7, BT-474, T-47D y MDA-MB-361. En contraste, MDA-MB-231 y SK-BR-3 son líneas que requieren de una matriz para formar MCTSs y utilizan  $\beta$ -integrina como unión (59). Estas uniones son de suma importancia para el fenotipo tumoral de las células en esferoides (60-63). En células no transformadas de epitelio mamario, se observó que la formación de uniones adherentes en los esferoides se regula por la activación de la cinasa PI3K, la cual mantiene la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -Catenina (64). Además, la resistencia multicelular (de la cual se hablará más adelante), también es mediada por estas uniones intercelulares. En un estudio se observó que la resistencia a fármacos antitumorales observada en las células crecidas como MCTS podía ser revertida utilizando anticuerpos contra las uniones de E-cadherina (58). Se ha reportado a presencia de desmosomas en los esferoides, y la proteína de los desmosomas CSPP-L parecería ser necesaria para la correcta polarización celular (60, 65). En la figura 2 se esquematizan las principales características microambientales de los esferoides multicelulares tumorales.



**Figura 2. Estructura y características microambientales de los esferoides multicelulares tumorales.** Se muestra la estructura esférica de los esferoides, donde se observa la formación de uniones intercelulares tridimensionales y la matriz extracelular dando estructura al esferoide. Así mismo, se esquematizan los gradientes que se forman del exterior al interior del MCTS ( $O_2$ , Nutrientes, factores de crecimiento, pH y desechos). La heterogeneidad poblacional que se presenta en los MCTS está constituida principalmente por células quiescentes, apo-necróticas y proliferativas.

Se ha reportado la producción de una matriz compleja durante el crecimiento de los esferoides. Diversos estudios han mostrado que gran parte de los componentes de la ECM, son producidos durante el cultivo en forma de MCTS y se asemejan bastante a la matriz presente *In vivo* (66). Una gran diferencia entre los MCTS y los tumores *In vivo*, consiste en que *In vivo* la matriz es producida por las células mesenquimales presentes en el tumor, mientras que en los esferoides esta es secretada por las células tumorales. El primer reporte de la presencia de matriz extracelular en el modelo de MCTS fue realizado en células de glioma (U-118 MG), en este estudio se observó que los esferoides contenía una matriz compuesta por fibronectina, laminina, colágeno y glucosaminoglicanos. Los autores sugieren que la matriz presente en los esferoides asemejaba la ECM presente en tumores *In vivo* (67). En MCTS's de cáncer de próstata, se observó que al parecer esta matriz se encuentra también recubriendo la superficie de los esferoides (60). Posteriormente, se observó que esferoides de líneas celulares de glioma generaban una mayor cantidad de ECM que sus contrapartes en monocapa. En estos MCTS se encontraron proteínas de la matriz como fibronectina y proteoglicano de Dermatan sulfato las cuales no se encuentran en los cultivos en monocapa (68). En otro estudio en el que se evaluó los componentes de la ECM en gliomas *In vivo*, en monocapa y en esferoides, se observó que cada sistema experimental conducía a una composición diferente de la ECM (69). En osteosarcoma, se observó que la composición y cantidad de ECM en los esferoides se encontraba en un punto intermedio entre tumores *In vivo* (xenotrasplantes) y los cultivos en monocapa (70). Además, se ha observado que la ECM de los esferoides es una barrera importante para la entrega de nanopartículas cargadas con fármacos, y el tratamiento previo con colagenasas mejora la eficiencia de este sistema de tratamiento (71). En conjunto esta evidencia experimental sugiere que el cultivo en forma de MCTS causa una deposición mayor de ECM y con mayor complejidad.

Una de las características microambientales más tempranamente descritas en el modelo de MCTS, fue la generación de gradientes de concentración de nutrientes, factores de crecimiento, oxígeno y pH, entre las células de la periferia de los esferoides y las células de las regiones internas (72). El fenómeno de hipoxia es el que más atención ha atraído sobre la biología de los esferoides. Cuando

los MCTS sobrepasan ciertas dimensiones, entre 400 y 500um, la difusión de oxígeno, y ciertos nutrientes se ve restringida a las células de las capas más superficiales de los esferoides, esto debido en parte a la difusión de dichos nutrientes y a la tasa metabólica de las células de la superficie, las cuales metabolizan el oxígeno y los componentes del medio de cultivo antes de que lleguen a las células internas (72, 73). Esto conduce a una heterogeneidad en los fenotipos de las células crecidas en forma de esferoide, donde las células de las regiones internas presentan un fenotipo hipóxico con un metabolismo primordialmente anaeróbico y las células de la superficie que se encuentran bien oxigenadas y con un metabolismo aerobio (74, 75). La concentración de oxígeno decae progresivamente conforme las células se alejan de la periferia, lo que conduce al desarrollo de un centro anóxico con células principalmente moribundas (76). Esto ha hecho que diversos autores consideren el modelo de MCTS como una aproximación al fenotipo de los tumores avasculares o bien a ciertas microrregiones hipóxicas y acidóticas de los tumores in vivo. La adaptación celular a la hipoxia conduce a la adquisición de un fenotipo más agresivo, reprogramación metabólica, características de células troncales cancerosas, invasividad y metástasis, así como un fenotipo de resistencia a distintos fármacos antineoplásicos (77).

La hipoxia en las regiones internas de los MCTS conduce a un cambio metabólico que resulta en la acidificación del medio extracelular, fenómeno conocido como acidosis. Se ha descrito en esferoides de distintos tipos celulares que conforme disminuye la concentración de oxígeno, se da una acidificación proporcional en el microambiente (78). En otro estudio se observó que la adquisición de un fenotipo glucolítico y resistente a la acidosis es necesario para la adquisición de un fenotipo invasivo. Este fenómeno se comprobó en tumores *In vivo*, donde la expresión de GLUT1 y NHE-1 (genes implicados en la adquisición de un fenotipo glucolítico y de resistencia a acidosis) se observó en células de focos premetastásicos con condiciones normóxicas (24). Incluso el cultivo de MCTS bajo condiciones de lacto-acidosis incrementa la multiresistencia a fármacos (79).

En los primeros estudios realizados con el modelo de los MCTS se observó que conforme el diámetro de los esferoides incrementaba, había una disminución en la cantidad de células en fase S del ciclo celular, así como un incremento en la cantidad de células en la fase G1. Este fenómeno se relacionaba con la disminución paulatina en el oxígeno y glucosa en las regiones internas de los esferoides que conducen a la adquisición de distintos fenotipos no proliferativos (80). El microambiente presente en los esferoides conduce al desarrollo de una heterogeneidad poblacional, en la cual se observa que las células de las capas superficiales de los MCTS son células proliferativas, las células de regiones más internas, donde ya hay una hipoxia importante, son células que se encuentran en un estado no proliferativo conocido como quiescencia y por último un grupo de células que se encuentran en el centro del esferoide que constituyen un centro aponecrotico (81). Se ha observado que esta heterogeneidad no está presente desde un inicio en los esferoides, sino que es resultado de los cambios paulatinos que se presentan en los mismos. En esferoides pequeños, de menos de 300um de diámetro, la expresión de Ki67 se distribuye de manera homogénea en todo el esferoide. En cambio, en esferoides de más de 400um, la expresión de Ki67 se restringe a las células de la periferia, el resto son poblaciones no proliferativas (82). Esta heterogeneidad poblacional presente en los MCTS regula el microambiente y este a su vez regula la heterogeneidad. En un estudio en el cual se modeló matemáticamente el efecto de la baja concentración de nutrientes y la acidosis en las poblaciones proliferativas y quiescentes de los esferoides, se observó que la hipoxia y la acidosis causan la aparición de las poblaciones quiescentes y necróticas. Mientras, que el balance entre las poblaciones proliferativas y quiescentes es responsable de la generación de acidosis en ciertas regiones del esferoide (83). Un grupo de proteínas conocidas como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI's) regula el fenotipo quiescente, en esferoides de carcinoma mamario de ratón y humano, se observó que la quiescencia era regulada por la expresión de los CKI's, p18 y p27, cuya expresión se localizaba en las regiones

internas de los esferoides. En cambio, la expresión de p21 se restringía a la región proliferativa, lo cual indica que p27 y p18 son los principales reguladores del fenotipo quiescente (84). Además, la compresión mecánica que se presenta en los esferoides, es capaz de inducir un fenotipo de arresto en G1 tardío (punto de restricción) acompañado de la expresión de p27 en las células del centro del esferoide (85). Se ha demostrado en esferoides de cáncer de próstata que P-glicoproteína (un transportador asociado con resistencia a fármacos) se sobreexpresa en la población quiescente de los esferoides, y dicho incremento en la expresión de P-glicoproteína depende de la expresión de p27 y p21, e implica que la heterogeneidad proliferativa se acompaña de la adquisición de fenotipos más agresivos (86).

El cultivo de células tumorales en forma de MCTS y el microambiente trae consigo la aparición de rasgos tumorales de mayor agresividad. Se ha observado en distintos tipos de tumores, que el cultivo de las células como esferoides conduce a un fenotipo con multiresistencia a fármacos, de reprogramación metabólica, con mayor capacidad metastásica y un incremento en las poblaciones de células progenitoras (87). Uno de los primeros fenómenos que se observó en los MCTS, fue una resistencia mayor al tratamiento con fármacos antineoplásicos que sus contrapartes en monocapa (88, 89). Inicialmente se pensó que el incremento en la resistencia se debía principalmente a una barrera de difusión que impedía la penetración de los fármacos a zonas internas de los esferoides, ya que diversos grupos habían reportado un gradiente de concentración de adriamicina en las diferentes capas de células del esferoide (90, 91). Posteriormente, se observó que la diferencia en la sensibilidad a diversos fármacos no sólo se debía a la penetración sino al microambiente completo (92, 93). Distintos grupos han demostrado que las diferentes poblaciones de los MCTS presentan distintas sensibilidades al tratamiento con fármacos antineoplásicos y son las poblaciones no proliferativas las menos sensibles (94). En un estudio más reciente se observó que la población quiescente de los MCTS de cáncer de colón presentaba una sensibilidad considerablemente menor a distintos fármacos como vinblastina, doxorubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo, que la población proliferativa y la misma línea crecida en monocapa (95). Además, el silenciamiento de p27 en las células tumorales conduce a una sensibilización de las mismas al tratamiento con ciclofosfamida (96). Sin embargo, no sólo la adquisición de un fenotipo quiescente es responsable del fenómeno de resistencia, se ha reportado que la hipoxia generada en los MCTS es responsable de una sobreexpresión de P-glicoproteína (ABCB1), lo que incrementa la resistencia (97, 98). Se ha reportado que en modelos tridimensionales, la hipoxia conduce a un fenotipo resistente a fármacos, gracias a la inducción de proteínas antiapoptóticas como BCL-2, survivina y una disminución en la actividad de la caspasa 3 (99). Otros componentes del microambiente también se han asociado con la resistencia, por ejemplo, el tratamiento de MCTS con hialuronidasa sensibiliza a las células (resistentes debido a la estructura tridimensional) al tratamiento con fármacos alquilantes (100). Este fenómeno de resistencia, se le ha llamado resistencia multicelular y se define como una disminución en la sensibilidad de las células cancerosas a diversos fármacos antineoplásicos, y que deriva de la interacción de las células tumorales con su microambiente (101). En nuestro grupo hemos observado que células tumorales crecidas como MCTS son menos sensibles al tratamiento con fármacos como Taxol, Cisplatino o Tamoxifen. Lo interesante de este estudio fue la observación de que esta resistencia se mantenía aun cuando estos fueran disgregados y cultivados en monocapa hasta por 5 pases (102). Estos resultados sugieren que las características de mayor agresividad observada en el cultivo de esferoides se encuentran reguladas en parte por mecanismos epigenéticos que pueden transferirse a las generaciones siguientes.

Otra característica fenotípica adquirida por las células crecidas como esferoides, es la de una migración e invasión incrementadas (103). En células MCF-7 de cáncer de mama, se observó que el cultivo en forma de MCTS conduce a un incremento en la capacidad migratoria en comparación con los cultivos en monocapa (104). Además, se ha observado que el cultivo de la línea MCF-7 como



MCTS conduce a un incremento en la expresión de genes de transición epitelio mesénquima (EMT) ( $\beta$ -Catenina, SNAIL), de migración (Vimentina, Citoqueratina y fibronectina) y de invasión (MMP-1, VEGF), con respecto a un cultivo en monocapa (105). Un fenómeno interesante fue que este fenotipo invasivo se encontraba enriquecido en las poblaciones proliferativas de los esferoides. También se ha observado que tanto la hipoxia como la hipoglicemia presente en regiones internas conducían a la adquisición de un fenotipo con un efecto warburg atenuado y una capacidad invasiva incrementada (106). Se ha demostrado que la hipoxia generada en los esferoides trae consigo cambios importantes en la expresión de genes reguladores de EMT como vimentina, N-cadherina y Fibronectina así como la producción de VEGF (107, 108). En cáncer de ovario, se observó que las células capaces de formar esferoides compactos presentaban un fenotipo invasor con características de transición epitelio-mesénquima (109). Esta evidencia experimental demuestra que el microambiente tumoral recapitulado en el modelo de esferoides trae consigo diversos fenotipos que se acompañan de rasgos migratorios e invasivos.

En los MCTS también se ha descrito una heterogeneidad metabólica. En un estudio pionero en el que se analizó el proteoma de las células de las poblaciones proliferativas (capas superficiales), poblaciones intermedias (población entre las capas superficiales y la región perinecrótica), poblaciones perinecróticas (poblaciones no proliferativas hipóxicas) y las células del centro necrótico de esferoides de la línea HT29 (cáncer de colon), se observaron grandes cambios en el metabolismo de las distintas poblaciones del esferoide. En comparación con las células de las capas superficiales, se observó que las células de la capa perinecrótica presentaban un incremento en la expresión de diversas proteínas de la vía de la glicolisis, así como actividades incrementadas de enzimas como malato deshidrogenasa, piruvato cinasa y citrato sintasa. Este resultado sugiere que las células perinecróticas presentan un fenotipo glucolítico y que utilizan diversas vías anapleróticas para producir metabolitos necesarios para vías anabólicas. En este estudio, se observó que en el centro necrótico existen pequeñas poblaciones de células viables, las cuales presentaban al igual que las células de la región perinecrótica un fenotipo hipóxico y glucolítico. Sin embargo, en esta población de células se observó un incremento en procesos como autofagia y metabolismo de ácidos grasos (110). Esto se ha observado en esferoides de cáncer de ovario, en los que se demostró un incremento en metabolitos de rutas glucolíticas, así como en aminoácidos de rutas anapleróticas como serina y glutamina, en comparación con cultivos en monocapa (111). El efecto Warburg se ha demostrado en el modelo de MCTS, en los cuales se ha observado que en respuesta a la hipoxia, las células utilizan predominantemente la glucolisis como medio para obtener energía, y esto se acompaña con una fuerte disminución en la fosforilación oxidativa (112). Además, se ha observado que al colocar esferoides en condiciones de hipoxia severa (0.1% O<sub>2</sub>), se acentúa aún más el efecto warburg previamente reportado (113). Estos estudios demuestran que el modelo de MCTS presenta una gran heterogeneidad poblacional, en la que células de diferentes regiones de los esferoides presentan distintos fenotipos proliferativos y metabólicos, que recapitulan más eficientemente la complejidad y heterogeneidad de los tumores *In vivo*.

Otro fenotipo de gran importancia para la evolución de todos los tipos de tumores, son las poblaciones de células tumorales que presentan un fenotipo troncal y que han sido nombradas células troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés). De acuerdo con la hipótesis de las CSC, en todos los tumores existe una pequeña fracción de CSCs, que preservan la capacidad de autorrenovarse (lo que genera progenie celular con el mismo fenotipo troncal) y de diferenciarse en células tumorales no troncales (114). Se ha observado que esta población de CSC es responsable de la iniciación en distintos tipos de cáncer, así como de la reincidencia posterior al tratamiento quirúrgico o farmacológico. Esta capacidad tumorigénica se ha definido experimentalmente como la capacidad de iniciar un tumor nuevo en un modelo animal inmunosuprimido, y se ha observado que es necesario un número mucho menor de células cancerosas con un fenotipo de CSC para iniciar

un tumor nuevo, que de células con un fenotipo no troncal (115). Además, la población de CSC es en parte responsable de la resistencia al tratamiento antineoplásico, del fenotipo metastásico y en general de la progresión de los tumores (116). El modelo de esferoides se ha utilizado ampliamente como un sistema que permite enriquecer a la población de CSC, y se usan habitualmente medios de cultivo definidos, en los que el suero se reemplaza por factores de crecimiento específicos (117, 118). En este modelo de esferoides, llamados clonogénicos, se ha observado que usualmente las células capaces de iniciar los esferoides son células que expresan marcadores de CSC y mantienen varias características de las mismas (119-123). Por esta razón el modelo de MCTS ha sido utilizado poco para estudiar la biología de la población de células troncales tumorales. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el cultivo como MCTS induce un incremento en la población de CSC, en cáncer de mama (124). Es importante destacar que a pesar de que hay pocos estudios que abordan la población de CSC en el modelo de MCTS, el microambiente que se presenta podría tener como consecuencia el incremento en esta población.

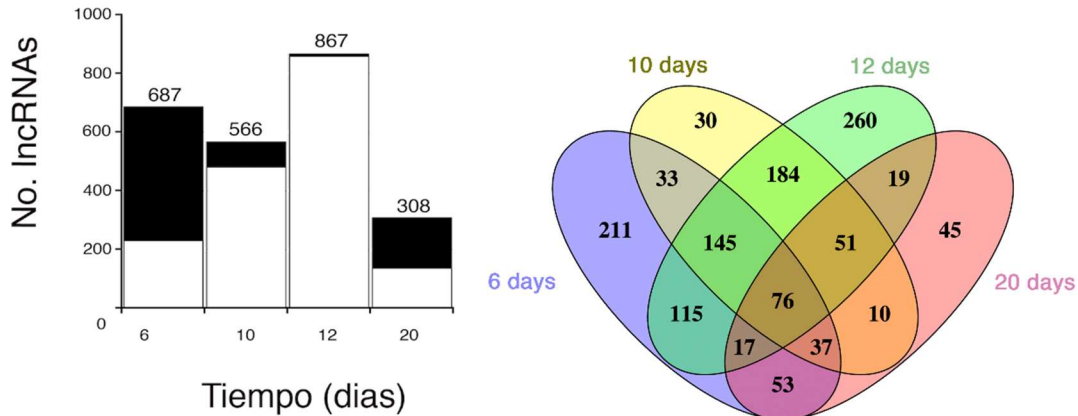
Todas estas características que se han descrito a lo largo de esta sección han demostrado que el modelo de MCTS constituye una herramienta de gran utilidad en el estudio de la biología de los tumores sólidos. Se ha considerado que los MCTS incorporan al modelo *In vitro* elementos microambientales que no están presentes en los modelos en monocapa, lo cual brinda una complejidad mayor al estudio de fenómenos fisiológicos en modelos *In vitro*. Sin embargo, el modelo de MCTS presenta el inconveniente de que no logra recapitular completamente el microambiente presente en los tumores *In vivo*, como la interacción de todas las poblaciones celulares que no son células tumorales, la matriz extracelular secretada por otros tipos celulares como fibroblastos, así como distintas hormonas paracrinas presentes en el cuerpo de los individuos. Distintos estudios han demostrado la semejanza del modelo de MCTS con sus contrapartes *In vivo* (125). En un estudio pionero se evaluó los perfiles transcripcionales de células de cáncer de pulmón crecidas en monocapa, MCTS y como xenotrasplantes *In vivo*, se observó que el modelo MCTS permitía recapitular mejor distintos perfiles transcripcionales observados en los xenotrasplantes. Estos perfiles transcripcionales se relacionaban con las funciones celulares de respuesta a hipoxia, proliferación, progresión del ciclo celular, angiogénesis, adhesión celular, y activación de interleucinas (126). En cáncer de ovario, el análisis mediante RNAseq entre células tumorales crecidas en monocapa y como esferoides demostró que existe una gran diferencia entre los perfiles transcripcionales de ambas condiciones. En este estudio se logró identificar tres nuevos procesos celulares enriquecidos en los esferoides, la respuesta al estrés oxidativo, mecanismos de mantenimiento de la integridad genómica y procesos epigenéticos como metilación del DNA y acetilación de histonas (127). Diversos estudios utilizan abordajes proteómicos han aportado más evidencia a la idea de que el crecimiento en forma de esferoides causa cambios importantes en el fenotipo de las células cancerosas y este fenotipo guarda mayor semejanza con el fenotipo de los tumores *In vivo* (128-130). En la mayoría de estos estudios se ha buscado explicar el efecto del microambiente de los MCTS sobre el fenotipo celular únicamente a través de la función de transcritos que codifican para proteínas, o bien las funciones directas de las mismas. Por otro lado, poco se ha estudiado de la participación de un grupo de transcritos que no codifica para proteínas conocido como RNAs no codificantes (ncRNA). Estos transcritos, son moléculas de RNA que no se traducen en proteínas o péptidos, pero que llevan a cabo una función biológica actuando como moléculas de RNA, y son clasificados en base a su longitud en ncRNAs pequeños (moléculas con una longitud menor a 200nt) y RNAs largos no codificantes (lncRNAs, moléculas de RNA con una longitud mayor a 200nt) (131). Dentro de los ncRNAs pequeño, el grupo que ha sido más ampliamente estudiado es el de los microRNAs (miRNAs). Un trabajo pionero de nuestro grupo de trabajo, mostró que el cultivo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en forma de MCTS condujo a un cambio en el nivel de expresión de 33 miRNAs en comparación con un cultivo en monocapa. Además, el

estudio específico de dos de estos miRNAs (miR-221-3p y miR-187) mostró que estas moléculas participan en la adquisición de un fenotipo invasivo, la supervivencia a la privación de factores de crecimiento y la regulación de la muerte celular (72). Este estudio mostró que la expresión de RNAs no codificantes, como era de esperar, responde al cambio en el microambiente presente en los MCTS y además, que estas moléculas están implicadas y son importantes para la adquisición de un fenotipo tumoral con rasgos de mayor agresividad (132). En otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, en el que se evaluó el perfil transcripcional de esferoides tempranos (6 días de cultivo) de células MCF-7, se observaron cambios importantes en la fracción de RNAs codificantes (mRNAs) cuya ontología génica mostró que estaban asociados con la adquisición de un fenotipo invasivo, así como con un metabolismo oxidativo fuertemente sobrerregulado. Sin embargo, se observó que también existían cambios importantes en la fracción de ncRNAs conocida como lncRNAs (RNAs largos no codificantes), con un total de 687 lncRNAs desregulados (Figura 1). Interesantemente, una fracción de los lncRNAs cuya expresión se vio afectada en los MCTS, presentaba un fenómeno de co-expresión con genes alelados, un análisis más detallado reveló que algunos de estos lncRNAs regulaba en cis a sus genes vecinos (104). Sin embargo, dada la complejidad funcional y molecular de los lncRNAs es necesario realizar un análisis a mayor profundidad para poder determinar su función específica en el fenotipo tumoral presente en los MCTS.

Posteriormente, se decidió evaluar el perfil transcripcional de esferoides de la línea MCF-7 pero con un crecimiento más prolongado, con el fin de evaluar transcritos que se asociaran con el microambiente del esferoide y la adquisición de la heterogeneidad presente en los esferoides maduros. En este estudio se analizó el transcriptoma de esferoides previa aparición de la hipoxia (10 días), posterior a la aparición de la hipoxia pero sin presentar centro necrótico (12 días) y esferoides con un microambiente como se ha descrito y además presentan ya un centro necrótico (20 días), y se comparó con un control confluyente crecido en monocapa (133). Al igual que en el estudio anterior, se observó que una gran cantidad de mRNAs modificaba su expresión en respuesta al microambiente que se presenta, observando vías activadas como HIF-1, p53, cMyc, STAT3, entre muchas otras, que indican precisamente el efecto de dicho microambiente sobre el fenotipo celular. Interesantemente una gran cantidad de lncRNAs también modificó su expresión en cada uno de los puntos evaluados mediante RNA-seq (Figura 3A). Lo que muestra que una gran cantidad de lncRNAs asociados con un fenotipo tumorigénico son regulados por estímulos microambientales. Como era de esperar, varios lncRNAs se expresan o dejan de expresarse específicamente en un tiempo del desarrollo del esferoide ante señales microambientales específicas (Figura 3B). Sin embargo, también se observó grupos de lncRNAs que o bien se compartían entre los estadios iniciales o entre los estadios tardíos del análisis, y un pequeño grupo de lncRNAs cuya expresión se modificó durante todo el desarrollo de los esferoides (Figura 3B). En el presente trabajo decidimos enfocarnos en este grupo de 76 lncRNAs cuya expresión cambió durante todo el desarrollo del esferoide, y evaluar el efecto de uno de estos lncRNAs en el fenotipo tumoral adquirido durante el crecimiento en forma de MCTS.

**A**

**B**



**Figura 3. Cambio en la expresión de lncRNAs durante el crecimiento de esferoides de la línea MCF-7.** A) se muestra el número de lncRNAs que incrementaron su expresión (fracción negra) y que disminuyeron su expresión (fracción blanca) en cada punto evaluado durante el crecimiento de los esferoides. B) Diagrama de Venn donde se muestra el número de lncRNAs que son específicos de cada fase del desarrollo de los esferoides, o bien que se comparten entre dos o más fases.

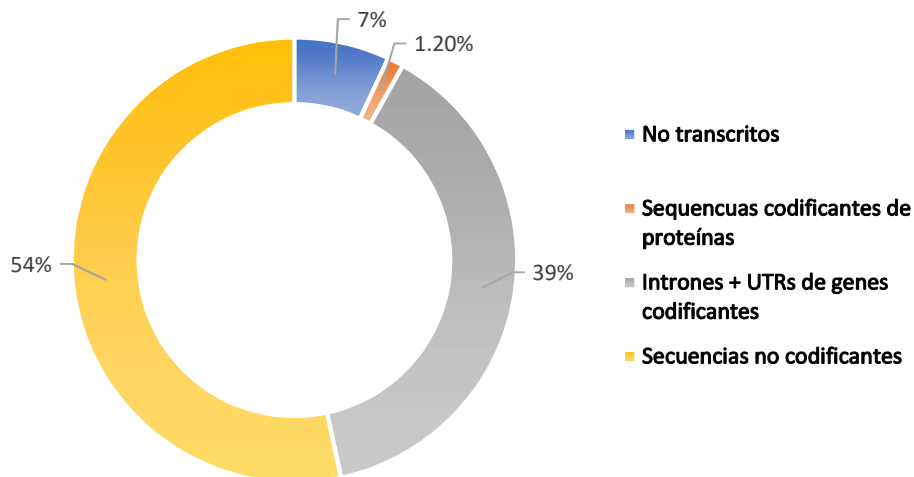
### RNAs largos no codificantes y su función biológica.

#### Antecedentes históricos de la investigación en lncRNAs.

El concepto del dogma central de la biología molecular, propuesto inicialmente por Francis Crick en 1958 y posteriormente por François Jacob y Jacques Monod, propone que el flujo de la información génica transita del DNA al RNA durante el proceso de transcripción y posteriormente del RNA a proteína durante la traducción (134). Esta idea ha conducido a que históricamente las moléculas de RNA sean consideradas únicamente como intermediarios entre el gen y la proteína que codifica. Distintas moléculas de RNA no codificante (ncRNA) fueron caracterizadas tempranamente, en 1955 el descubrimiento del primer RNA ribosomal por Georges Palades (rRNA) y el descubrimiento del RNA de transferencia (tRNA) por Mahlon Hoagland y Paul Zamecnik en 1957, incluso antes de la invención del término mRNA por François Jacob y Jacques Monod en 1960 (135). Posteriormente, en 1984(136), el equipo de Masayuki Inouye descubrió en *E. Coli* el primer ncRNA. Este ncRNA fue una molécula de RNA pequeño nombrado micF, el cual reprime la traducción de un mRNA que codifica para una Porina (OmpF), mediante la unión directa de micF con el sitio de unión del ribosoma en el mRNA de OmpF (136). Posteriormente, a finales de los 1980s se descubrió un fenómeno de impronta génica. En este contexto se descubrió que el gen *Igf2R* se expresaba del alelo paterno, mientras que el alelo materno expresaba el gen H19, y la impronta del alelo materno de *Igfr2* dependía de la expresión de H19 y la delección de H19 resultaba en letalidad prenatal (137). La caracterización inicial de H19 mostró que este transcrito no se unía a ribosomas a pesar de contar con marcos de lectura abierto (ORFs) pequeños, pero comparte características de un mRNA como el ser transcrito por la RNAPol II, y procesado (presenta 5'cap, 3'poliadenilado y presenta un procesamiento por splicing) (138). H19 constituye el primer ejemplo de un ncRNA largo (lncRNA) descubierto en eucariontes, sin embargo, su función como molécula de RNA permaneció sin estudiar hasta el descubrimiento de otro RNA asociado con la compensación de dosis génica en mamíferos, el lncRNA XIST. El proceso de inactivación del cromosoma X en mamíferos fue descubierto en 1961 por Mary Lyon y consiste en la represión epigenética de la mayoría de los genes localizados en uno de los dos cromosomas X de las hembras (139). La inactivación del cromosoma X

es regulada por un locus único conocido como el centro de inactivación del cromosoma X. A principios de los 1990s se descubrió que este locus transcribía un lncRNA, al cual se conoció como transcrito específico del cromosoma X inactivo (Xist). Este transcrito se expresa durante el desarrollo temprano a partir de uno de los cromosomas X, y conduce al silenciamiento casi total de este cromosoma (140, 141). Estos trabajos pioneros, en los cuales se describieron las funciones regulatorias de dos lncRNAs en mamíferos que diferían significativamente de las funciones “housekeeper” de los ncRNAs descubiertos hasta ese momento, permitieron demostrar una nueva diversidad funcional para moléculas de RNA no codificante.

La publicación del genoma humano, inicialmente el 96% de las regiones de eucromatina en el 2001 y la secuencia completa en el 2003, trajo consigo un cambio importante en la forma de concebir la complejidad genómica del *Homo sapiens* (142). Uno de los hallazgos más inesperados de la secuenciación del genoma humano fue el pequeño número de genes que codificaban para proteínas en comparación con las proyecciones iniciales. En un estudio temprano en el que se utilizaba la repartición de islas CpG para predecir el número de genes, se estimó un total de entre 70,000-80,000 genes codificantes de proteínas (143). En un inicio el proyecto del genoma humano predijo alrededor de 31,000 genes codificantes de proteínas, pero este número se redujo a 22,287 genes codificantes de proteínas en el 2004 (142, 144). Otro fenómeno importante que fue descrito a partir de los datos del proyecto del genoma humano fue el denominado transcripción pervasiva, que consiste en que la mayoría del genoma es transcrito, independientemente de si codifica para proteína o no (145). Fenómeno que fue corroborado tiempo después por los grandes consorcios como FANTOM y RIKEN (146, 147). El descubrimiento de la transcripción pervasiva generó grandes debates respecto a la funcionalidad biológica de estos ncRNA, por lo que durante varios años se consideró que la mayor parte de estos RNAs eran únicamente ruido transcripcional y se denominó al DNA no codificante como DNA basura (148). Recientemente el proyecto ENCODE, estimó que cerca de un 93% del genoma humano se transcribe y se asocia con la producción de un único transcrito. De este total de transcritos, cerca del 1.2% corresponde a exones de genes codificantes, cerca de un 39% se transcribe en regiones intrónicas y UTR's, y finalmente un 54% de transcritos mapean fuera de genes codificantes para proteínas (Figura 4) (149). Posteriormente, con el desarrollo del proyecto NONCODE, una base de datos encargada de recopilar y anotar a nivel genómico los distintos tipos de RNAs no codificantes (especialmente lncRNAs), se observó en su versión más reciente, mediante una curación sistemática de distintos datos genómicos, que en el genoma humano se han mapeado alrededor de 96,308 genes de lncRNAs y producen alrededor de 172,216 transcritos de lncRNAs (150).



**Figura 4. Proporción de secuencias codificantes y no codificantes en el genoma humano.** Regiones no transcritas del genoma corresponden a un 7%, Secuencias que corresponden a exones de genes codificantes corresponden a un 1.2% del genoma, Regiones que corresponden a secuencias intrónicas y UTR's de genes codificantes corresponden a un 39% y regiones que se transcriben, pero no corresponden a un gen codificante corresponden 54%. Modificado de Jarroux, J., et al., 2017 (135).

### Biología y función de los lncRNAs

El creciente interés de una gran parte de la comunidad científica en descubrir el papel biológico de estas moléculas ha conducido a que se genere un gran cuerpo de conocimiento sobre las características biológicas de los lncRNAs. La familia de los lncRNAs que por definición son aquellas moléculas de RNA que no tienen la capacidad para producir proteínas y que tienen un tamaño mayor a los 200 nt (esto con el fin de diferenciarlas de las moléculas de ncRNA pequeñas como miRNAs), es en realidad un grupo heterogéneo de moléculas con distintas propiedades genómicas, regulatorias y funcionales, que dificultan una organización conceptual unificadora de las mismas. En la presente sección, se hablará de aquellos conceptos generales que se han utilizado para caracterizar y organizar el conocimiento de los lncRNAs.

A pesar de que por definición los lncRNAs no codifican para proteínas, se ha demostrado que algunos lncRNAs pueden asociarse con ribosomas y producir péptidos pequeños, pero son pocos los ejemplos funcionales (151). Un ejemplo, es el lncRNA dwarf que se expresa en músculo cardíaco y que codifica para un péptido de 34 aminoácidos (DWORF), el cual se asocia con la función de SERCA y la contracción del músculo (152). Sin embargo, en este contexto cabría esperar la generación de un concepto de bifuncionalidad, que explique una función doble de ciertos lncRNAs, tanto como moléculas de RNA y como péptidos pequeños con funciones biológicas independientes.

La gran mayoría de los lncRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, sin embargo, algunos lncRNAs como NDM29 (asociado a neuroblastoma humano) son transcritos por la RNA polimerasa III (153). Así mismo, muchos lncRNAs anotados son objeto de procesamiento postranscripcional, observándose la presencia de CAP en el extremo 5', el corte y empalme alternativo y la adición de una cola de poli(A) en el extremo 3' (154). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que una gran cantidad de lncRNAs no presentan poli(A) en el extremo 3' y usualmente son invisibles en abordajes que analizan únicamente transcritos poliadenilados (155). Además, algunos lncRNAs son

considerados dimorficos en el sentido de que se pueden encontrar en formas poliadeniladas o no-poliadeniladas, como es el caso de NEAT1 y MALAT (156). En un estudio reciente, en el que se evalúan las distintas modificaciones postraduccionales del dominio CTD de la RNAPol II en función del proceso de transcripción de los lncRNAs, se observó que la transcripción de los lncRNAs puede en algunos casos ser muy parecida a la de los mRNAs. Sin embargo, existe una gran cantidad de genes de lncRNAs en los que el proceso transcripcional resulta diferente, en el sentido de que presentan diversos sitios de inicio transcripcional, la elongación de la RNAPol II se detienen en distintas zonas del gen y los fenómenos de procesamiento no ocurren en puntos específicos del transcrito y constituyen así unidades transcripcionales con dinámicas propias (157). Esta diversidad transcripcional de los lncRNAs dificulta la generalización conceptual de distintas características, y permite evidenciar la heterogeneidad propia de este grupo de moléculas.

En lo que respecta a la regulación a nivel de cromatina de los genes de lncRNA, las marcas postraduccionales de histonas son muy semejantes a lo observado en genes codificantes de proteínas. Se ha observado que los promotores de los lncRNAs se encuentran dentro de regiones hipersensibles al tratamiento con DNasa I, sugieren regiones desprovistas de nucleosomas. Además, se ha observado que los promotores de los lncRNAs presentan niveles inferiores de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), en comparación con los promotores de los genes codificantes, esto puede ser por el nivel inferior de expresión de los lncRNAs. En el caso de aquellos lncRNAs que se expresan en regiones enhancer o en promotores (eRNAs y PROMPTs, respectivamente), se ha observado que presentan altos niveles de la monometilación en la lisina 4 de la histona H3, y acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K4me1 y H3K27ac, respectivamente), que se consideran marcas de unidades transcripcionales asociadas a enhancers o promotores (158). Generalmente el cuerpo de la mayoría de los genes de lncRNAs, con excepción de los eRNAs y PROMPTs, presenta un incremento en la marca de trimetilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) (159).

Una característica importante de la expresión de los lncRNAs consiste en sus dinámicas específicas de expresión y decaimiento. La medición del tiempo de vida media de los lncRNAs en ratón por inhibición transcripcional con actinomicina B, mostró que los lncRNAs presentaban una vida media dentro del rango de los 30 minutos a las 48 hrs, rango similar al de los mRNAs, los lncRNAs presentan una estabilidad menor de 4.8 hrs, comparada con la vida media de 7.7hrs para los mRNAs. Además, la proporción de lncRNAs clasificados como inestables (vida media menor a 2 hrs) comprendía un alto porcentaje, mientras que pocos (Neat1) fueron clasificados como estables (vida media mayor a 12 hrs) (160). Distintos ensayos en los que se analizó el transcriptoma global de distintos tejidos han demostrado que los lncRNAs, en comparación con los transcritos codificantes, presentan una expresión más específica en relación con el patrón espaciotemporal de desarrollo o con el tipo celular o de tejido. Existe una pequeña minoría de lncRNAs cuya expresión es ubicua, como TUG1 o MALAT1 (161-163). La mayoría de los lncRNA expresados de forma ubicua presentan una expresión elevada, pero en el caso de los lncRNAs cuya expresión es más restringida se observa una expresión baja, incluso al nivel de ser de unas cuantas copias por célula (164). Esta alta especificidad en la expresión sugiere que estos transcritos participan en mecanismos muy precisos de regulación y que requieren una modulación fina por el contexto celular.

El RNA es una molécula dinámica que puede plegarse y adoptar estructuras complejas, las cuales son necesarias para definir la función de la molécula, así como su estabilidad, localización celular y con qué moléculas puede interactuar (165). Distintos grupos han demostrado que la estructura secundaria del lncRNA constituye la unidad funcional de los mismos, y usualmente esta estructura se conserva durante la evolución de los organismos (166). En un estudio en el que se comparó la secuencia del lncRNA HOTAIR entre 33 secuencias distintas de mamíferos, mostró que aun cuando existen cambios en la secuencia, se conservaban motivos estructurales, en especial en las regiones

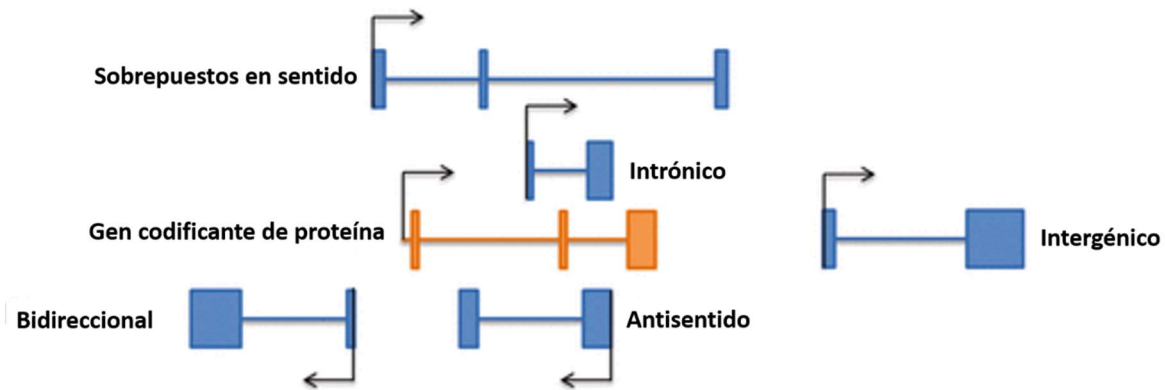
de unión a proteínas (167). Sin embargo, existen ejemplos en los que cambios recientes en la secuencia de lncRNAs que impactan en la estructura genera nuevas funciones y especializaciones para este tipo de genes. HAR1 (Human accelerated región 1) es una región de evolución reciente, que expresa un lncRNA en la neocorteza en desarrollo de los primates. En humanos, este transcrito tiene una estructura estable que no se observa en otros primates y que se relaciona con la adquisición de ciertas características de la especie (168). Sin embargo, aún falta el desarrollo de más y mejores herramientas que permitan predecir adecuadamente la estructura que un transcrito puede adoptar en condiciones fisiológicas.

### Clasificación de los lncRNAs

El descubrimiento de los lncRNAs como un tipo completamente nuevo de transcritos generó la necesidad de clasificarlos y agruparlos en grupos que pudieran dar un sentido a su biología. Una de las primeras clasificaciones de los lncRNAs tiene como base la localización genómica y su relación con genes codificantes de proteínas. Esta clasificación es utilizada por GENCODE/Ensembl, pero también se usa con frecuencia para clasificar transcritos ensamblados de novo. Los lncRNAs en base a su localización relativa a los genes codificantes, se dividen en dos grandes grupos: aquellos cuya unidad transcripcional no se intercepta con ningún gen codificante y se denominan intergénicos (long intergenic ncRNAs, lincRNAs), y aquellos cuyas unidades transcripcionales se interceptan con las unidades transcripcionales de genes codificantes y se denominan intragénicos. En la figura 5 se esquematiza la clasificación de lncRNAs respecto a su localización (159). En el caso de los lncRNAs intragénicos, estos se pueden dividir a su vez en más subtipos y dependen de la posición y relación con el gen codificante:

- **lncRNAs antisentido:** asRNAs o ancRNAs, estos transcritos se encuentran en la cadena antisentido a un gen codificante y se sobrelapan total o parcialmente con este. En este grupo se han incluido los llamados NATs (Natural antisense transcripts), los cuales a su vez se subdividen en cis-NATs (que afectan la expresión de los transcritos con los que se interesectan) y trans-NATs (que regulan la expresión de transcritos en otra posición genómica (169). Se ha descrito que cerca del 70% de los genes codificantes presentan una transcripción antisentido, produciendo NATs, los cuales pueden activar o inactivar la expresión de los genes sentido (170).
- **lncRNAs bidireccionales:** Estos transcritos se originan de la cadena opuesta de un gen codificante, pero no se sobrelapan o se sobrelapan parcialmente con el extremo 5' del gen codificante. Estos lncRNAs se producen usualmente a partir de promotores bidireccionales y se han considerado como transcritos poco estables (171, 172). Distinta evidencia sugiere que la transcripción bidireccional de lncRNAs tiene un efecto en la regulación del gen codificante adyacente, sugieren que este fenómeno constituye una capa más de regulación transcripcional (173).
- **lncRNAs Intrónicos:** los lncRNAs intrónicos se producen a partir de intrones de transcritos codificantes, y pueden constituir unidades transcripcionales independientes del gen hospedero, o bien, se producen durante el procesamiento de los transcritos codificantes. Los RNAs intrónicos circulares (ciRNAs) son un ejemplo de RNAs que se producen a partir de intrones en lazo (174). En el caso de los lncRNAs intrónicos cuya expresión es independiente de su gen blanco, se les ha llamado RNAs no codificantes totalmente intrónicos (TIN), y se ha observado que estos pueden transcribirse de intrones de un 74% de los genes anotados en RefSeq (175). Incluso se ha propuesto la existencia de al menos 78,147 lncRNAs intrónicos en humano (176).
- **Transcritos sobrepuestos en sentido (overlapping sense transcripts):** Estos transcritos incluyen algunos exones o la mayoría de los intrones de un gen codificante, y son transcritos en la misma dirección que el gen codificante. Un ejemplo de estos transcritos es SOX2-OT, el cual contiene en su primer intrón al gen codificante de SOX2. SOX2-OT se ha propuesto como un regulador de la expresión de SOX2 (177).





**Figura 5. Clasificación de los lncRNAs en relación con su localización respecto a genes codificantes.** Se muestra de forma esquemática los distintos tipos de lncRNAs (azul) en relación con su posición respecto a un gen codificante de proteína (naranja). Modificado de Jarroux, et al., (2017) (135).

Otra clasificación útil de los lncRNAs que se ha planteado, y diversos grupos la utilizan para caracterizar adecuadamente distintos lncRNAs, se basa en la residencia de los genes de lncRNAs en distintos elementos reguladores, es decir si se expresan a partir de elementos regulatorios como enhancers o promotores. Esta clasificación incluye los siguientes subtipos:

- **lncRNAs derivados de pseudogenes:** Los pseudogenes son remanentes genómicos de genes codificantes ancestrales que han perdido la capacidad codificante, muchos de ellos se transcriben dando lugar a lncRNAs (pseudogene derived lncRNAs). Dada la semejanza de estos pseudogenes con los genes codificantes parentales, los lncRNAs derivados de pseudogenes pueden regular la expresión de ciertos mRNAs mediante la interacción con miRNAs, o bien la producción de endo-siRNAs (178).
- **T-UCRlncRNAs:** En el genoma humano se han descrito hasta el momento 481 regiones ultra conservadas (UCR) entre humano, ratón, y rata (179). Estas regiones se transcriben en los así llamados T-UCRlncRNAs (180). En neuroblastoma se ha observado una expresión diferencial de estos T-UCRlncRNAs entre tejidos sanos y tumores. Además, se ha demostrado que la expresión de estos transcritos responde a estímulos ambientales como el tratamiento con ácido retinoico, y regulan el efecto biológico de una disminución de n-Myc (181).
- **RNAs que contienen repetidos teloméricos (TERRA):** Los telómeros de todos los eucariontes se transcriben en RNAs no codificantes conocidos como TERRA. Estos lncRNAs se producen a partir de ambas cadenas del DNA telomérico y dependen de la fase del ciclo celular (182). Se ha observado que los ncRNAs TERRA forman híbridos RNA-DNA en los extremos de los cromosomas, promoviendo la recombinación y retrasa el fenómeno de senescencia. Sin embargo, en células carentes de telomerasa y reparación homóloga, la expresión de TERRA induce el acortamiento de los telómeros y acelera la senescencia (183).
- **lncRNAs centroméricos:** Distintos estudios han mostrado que los repetidos centroméricos se transcriben activamente durante mitosis tardía hasta G1 temprana y producen distintos lncRNAs. Estos lncRNA interactúan con distintas proteínas del centrómero como CENP-A/CENP-C y HJURP, y se ha observado que participan en el ensamblaje correcto de los cinetocoros (184-187).
- **Transcritos antisentido de promotores y pre-rRNA (PAPAS):** Se ha observado que loci de DNA ribosomal se transcribe en antisentido por la RNAPol II, lo que produce una población heterogénea de lncRNAs llamados PAPAS (promoter and pre-rRNA antisense). La expresión de estos transcritos inducen quiescencia mediante el reclutamiento de Suv4—20h2 y el posterior silenciamiento de los genes de rRNA (188).
- **lncRNAs asociados a regiones enhancer (eRNAs):** Los enhancer son un tipo de elementos regulatorios en Cis, que activan la expresión de genes distales. Se ha observado que muchos enhancers se transcriben en RNAs no codificantes llamados eRNAs. Los enhancers que son transcritos usualmente presentan marcas de histonas específicas como el enriquecimiento de la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 y la monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1). Se ha

propuesto que los eRNAs regulan la interacción de los enhancers de los que se transcriben con sus promotores blanco, además de regular el ambiente de la cromatina en los promotores, el reclutamiento de factores de transcripción y la iniciación de la RNAPol II (189).

- **lncRNAs asociados a promotores (PALRs):** Al igual que los enhancers, muchos promotores de genes codificantes se transcriben y producen lncRNAs, tanto de la cadena sentido como de la antisentido, y pueden sobrelaparse con el extremo 5' de los genes codificantes (190). En este grupo de lncRNAs también se encuentran los PROMPTs (transcritos río arriba de los promotores) y los uaRNAs (RNAs antisentido río arriba), los cuales son transcritos muy inestables, que pueden llegar a requerir la depleción del exosoma nuclear para poder estudiarlos (191). La diferencia entre los PROMPTs y los uaRNAs constituye en que los primeros se encuentran en sentido al gen codificantes y los segundos en antisentido. Se ha propuesto que la degradación de los PROMPTs dependiente de poliadenilación permite asegurar la direccionalidad en la producción del RNA codificante en promotores bidireccionales (192). En el caso de los uaRNAs, se ha observado que también pueden regular la direccionalidad de los promotores y la posterior expresión del gen codificante adyacente (193).

La clasificación de los lncRNAs ha sido un tema de intenso estudio que ha generado diversos sistemas de clasificación. Estos sistemas de clasificación se ha revisado extensamente en otros textos, por lo que no se considera necesaria su revisión en el manuscrito presente.

### Mecanismos de acción de los lncRNAs

Como se ha discutido previamente, generalmente los lncRNAs presentan niveles bajos de expresión en comparación con otros RNAs, y tienen una expresión tejido-específica más restringida a ciertas líneas celulares o tejidos. Esto sugiere que la regulación de la expresión de los lncRNAs es finamente modulada, y a su vez los lncRNAs regulan finamente distintos procesos celulares. Actualmente, se desconoce la función y mecanismo de acción de la gran mayoría de los lncRNAs. Sin embargo, la caracterización funcional de muchos de ellos ha permitido identificar distintos mecanismos de acción que de manera esquemática engloban la función de varios grupos de lncRNAs.

Una de las principales funciones de muchos de ellos, es la regulación transcripcional de genes blanco, mediante la modulación del ensamblaje de la maquinaria transcripcional o la modulación de la acción de factores de transcripción en regiones promotoras o enhancers. Los lncRNAs pueden regular la transcripción y actúan como factores en Cis, o factores en Trans. La regulación en Cis por lncRNAs ocurre cuando el lncRNA regulatorio y el gen blanco se transcriben a partir del mismo locus (194). HOTTIP es un ejemplo claro de un lncRNA que actúa en Cis, este lncRNA se expresa en el clúster de los genes HOXA ante ciertos estímulos ambientales. Cuando HOTTIP se expresa, el enhancer del que se transcribe cambia los promotores blanco a los que se une. HOTTIP además interactúa con WDR5, lo que permite localizar al complejo MLL en los promotores blanco y activar su expresión (195). Además, muchos NATs tienen una función en Cis sobre el gen en sentido. Por ejemplo, el lncRNA ANRIL se transcribe en antisentido a los genes de CDKN2A y CDKN2B, e interactúa con la proteína CBX7 del complejo represivo Polycomb 1 (PRC1) y Jarid2 del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2), lo que conduce al silenciamiento epigenético de los genes en sentido (170).

En el caso de los lncRNAs que presentan funciones en Trans, se sabe que distintos lncRNAs pueden regular la expresión de genes blanco que se encuentran en sitios distales de su unidad transcripcional, incluso en otros cromosomas (196). Este es el caso del lncRNA HOTAIR, un lincRNA que se encuentra en el locus HOXC, pero reprime la expresión de varios genes en el locus HOXD (en otro cromosoma) mediante el reclutamiento de los complejos PRC2 y LSD1 (197). Incluso, en cáncer de mama se demostró que regula más genes fuera del locus HOXD (198). Otro ejemplo de lncRNA con funciones en Trans, son aquellos transcritos que interactúan directamente con proteínas o

miRNAs, y de esta manera regulan la función de las mismas. Por ejemplo, el lncRNA NKILA, que se expresa como resultado de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, interactúa con el complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B e inhibe esta manera la fosforilación de I $\kappa$ B por IKK (199).

Además de esta diferenciación funcional de los lncRNAs entre aquellos que llevan una función en Cis o en Trans, se ha descrito una variedad más grande de funciones lo que ha permitido identificar ciertos mecanismos funcionales generales que pueden explicar la función de varios lncRNAs (200). Las distintas funciones de los lncRNAs descritas hasta la fecha son las siguientes.

- **lncRNAs señales:** La alta especificidad en la expresión de los lncRNAs indica que pueden servir como señales moleculares, que permiten integrar las señales de desarrollo, el contexto celular y el contexto microambiental, con el fin de producir una respuesta celular adecuada. Algunos transcritos dentro de esta clase actúan como moléculas regulatorias, mientras que en otros casos es la transcripción el fenómeno regulatorio y el lncRNA un producto secundario. Se ha pensado que los lncRNAs en este grupo pueden funcionar como marcadores de eventos biológicos específicos. Como ejemplo de este grupo de lncRNAs se utiliza comúnmente a lncRNAs implicados en el proceso de impronta génica, como es Kcnq1ot1, Air o Xist. En el caso de Air, está implicado en la impronta del gen Igf2r en el alelo paterno. En placenta se ha observado que la expresión de Air, a partir del segundo intrón del gen Igf2r, recluta a modificadores epigenéticos como G9a y PRC2 y reprimen epigenéticamente la expresión de Igf2r (194). En los tejidos embrionarios, se ha observado que la transcripción de Air es suficiente para silenciar la expresión del gen sobrelapado (201). En este ejemplo, Air funciona como una señal que regula la impronta del gen Igf2r en un contexto espaciotemporal específico.
- **lncRNA señuelo:** Estos lncRNAs llevan a cabo su función al unirse a una molécula efectora, usualmente una ribonucleoproteína o factor de transcripción (RNP o TF), y mediante esta interacción impide que la molécula efectora lleve a cabo su función biológica. Un ejemplo de este tipo de lncRNAs es PANDA, este transcrito es regulado por p53 ante un estímulo de daño al DNA, la transcripción de PANDA inhibe la expresión de genes proapoptóticos y permiten que primero se dé un arresto en el ciclo celular y se intente reparar el daño. PANDA se une directamente al factor de transcripción NF- $\kappa$ B y lo secuestra impidiendo que lleve a cabo su función proapoptótica (202).
- **lncRNAs guías:** Estos lncRNAs se unen a proteínas y dirigen el complejo nucleoproteico a blancos específicos. Los lncRNAs guías pueden tener funciones tanto en Cis (como los eRNAs) como en trans. Además de que su función la pueden llevar a cabo a través de complejos activadores como tritorax (Trx) o represivos como Polycomb (PRC), o incluso a través de distintos factores de transcripción. HOTTIP es un lncRNA guía que se transcribe a partir de un enhancer del clúster de los genes HOXA, y regula la formación de un bucle entre el enhancer y distintos promotores. Además, HOTTIP interactúa con el complejo MLL y lo localiza en los promotores de los genes blanco de HOTTIP, lo que activa su transcripción(195). HOTAIR cumple su función como RNA guía en Trans, este lncRNA se transcribe a partir del clúster de los genes HOXC y reprime la transcripción de cerca de 40kb del locus HOXD en un cromosoma diferente. HOTAIR funciona como guía de los complejos PRC2 y LSD1 (197).
- **lncRNAs de andamiaje:** Distintos lncRNAs pueden servir como plataformas moleculares en las que distintos componentes moleculares son ensamblados. La formación de estos complejos macromoleculares resulta importante para el control preciso de distintas vías de señalización (203). Se ha propuesto que los lncRNAs de andamiaje son moléculas con una alta complejidad, que presentan distintos dominios funcionales que les permiten interactuar con varias moléculas efectoras. NEAT1 es un lncRNA altamente expresado en distintos tejidos, el cual es importante para el ensamblaje de los paraspeckles (204, 205).
- **lncRNAs esponjas de miRNAs:** Los lncRNAs al igual que los mRNA son blancos de miRNAs y son regulados a nivel postranscripcional por estas moléculas. Recientemente, se ha descubierto que estos lncRNAs, a los que se les ha llamado competing endogenous RNAs (ceRNAs), pueden competir por la unión de miRNAs con otras moléculas de RNA como los mRNAs. Esto implica que la expresión de un ceRNA titularía un miRNA o una familia de miRNAs, lo que deja una concentración activa menor del miRNA y por consiguiente liberan del silenciamiento otros mRNAs (206). lincRNA-ROR induce un fenotipo de CSC (Cancer Stem Cells) gracias a que funciona como lncRNA esponja de diversos miRNAs supresores de tumor, dentro de los que destacan algunos miembros de la familia Let-7 (207).

Existen distintos ejemplos de lncRNAs que cumplen su función biológica a través de varios mecanismos funcionales. HOTAIR como se mencionó antes funciona como guía de los complejos PRC2 y LSD1, que regula su localización en blancos específicos, pero también HOTAIR funciona como una molécula de andamiaje que permite la formación de un complejo que incluye a PRC2 y LSD1.

### **lncRNAs en cáncer**

Como se ha mencionado en secciones previas, los lncRNAs son moléculas que responden a estímulos fisiológicos específicos, lo que les confiere una alta especificidad en su expresión. Esto también es cierto para la función de estas moléculas en distintos estados patológicos, donde se ha observado que su expresión fuera de contexto se correlaciona con un fenotipo patológico o la progresión de una enfermedad (208, 209). En cáncer se han demostrado cambios en la función de una gran cantidad de lncRNAs, que se asocian con la progresión de la enfermedad. Es importante mencionar que al igual que ocurre con las proteínas, existen lncRNAs cuya ganancia de función o incremento de expresión trae consigo la adquisición de rasgos tumorales, comportándose, así como oncogenes. Mientras que otros lncRNAs tienen una función supresora de tumor, observándose que su pérdida de función o disminución en la expresión conducen a la adquisición de un fenotipo tumoral (154). Con el fin de esquematizar la asociación de los lncRNAs con el fenotipo canceroso, se utilizarán los hallmarks del cáncer descritos por Hanahan D., y Weinberg, RA. (2011) (210).

- 1. Señalización proliferativa sostenida:** Una de las primeras características descritas de las células cancerosas es su capacidad de proliferar constantemente y con una cierta independencia de estímulos externos (210). El lncRNA SRA (Steroid Receptor Activator) se sobreexpresa en tejidos mamarios cancerosos, y estos altos niveles de SRA se asocia con una señalización anormal de los receptores de estrógeno y progesterona (ER y PR) (211). Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que SRA codifica para una proteína que también puede funcionar como coactivadora o correpresora. El balance entre el transcrito no-codificante y la proteína se debe principalmente a una regulación por splicing alternativo (212). En cáncer de próstata se ha observado que PCAT-1 (prostate cancer associated transcript 1), un lncRNA con una elevada expresión en la enfermedad, regula la expresión de genes asociados a ciclo celular y mitosis, y su silenciamiento disminuye la tasa proliferativa de las células cancerosas (213).
- 2. Evasión de supresores de crecimiento:** Además de mantener una señalización proliferativa sostenida, las células tumorales usualmente adquieren la capacidad de evadir aquellas señales que permiten suprimir el crecimiento (210). ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus) es un lncRNA que se codifica en antisentido al locus de P14-p15, y su expresión elevada en distintos tumores se asocia con su silenciamiento. ANRIL puede interactuar con PRC2 y PRC1 y guiarlos al locus de INK4 y silenciar la expresión a nivel epigenético (214, 215). Además, tienen funciones como supresores de tumor, GAS5 (Growth arrest-specific 5) es un lncRNA que interactúa con el dominio de unión al DNA del receptor de glucocorticoides (GR) compitiendo con los elementos de respuesta a glucocorticoides y reprime la actividad transcripcional del GR (216). La expresión de GAS5 en células de cáncer de próstata y de mama induce el arresto en el crecimiento y el aumento en la apoptosis (217).
- 3. Adquisición de inmortalidad replicativa:** En comparación con las células normales, que sólo pueden llevar a cabo un número limitado de divisiones celulares debido al acortamiento de los telómeros, las células cancerosas adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente. Esto gracias a que cerca del 90% de todos los tumores expresan de manera anormal la enzima Telomerasa e impide así el acortamiento de los telómeros. El 10% de los tumores restantes utilizan un alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), una vía de alargamiento no conservativa que involucra la transferencia de repetidos entre cromátides hermanas (210). La holoenzima Telomerasa, tiene dos componentes, una transcriptasa reversa (TERT) y un lncRNA conocido como TERC. La transcriptasa reversa utiliza una pequeña región de TERC como templado para sintetizar los telómeros (218). Esto ha hecho que el gen

de TERC se encuentre amplificado en distintos tipos de tumores (219, 220). Otro lncRNA asociado con la función de los telómeros, son TERRA, se localizan en los telómeros y participan en la formación de heterocromatina (221). Además, se ha observado que TERRA es un inhibidor de la actividad de la telomerasa que puede actuar en el telómero en el que se transcribe o bien a nivel global (222).

4. **Capacidad Invasiva y metástasis:** En tumores malignos, eventualmente algunas poblaciones celulares del tumor primario adquieren la capacidad de invadir tejidos aledaños sanos, entrar en el torrente sanguíneo y colonizar tejidos distantes. Este fenómeno conocido como metástasis es un proceso biológico que incluye distintas etapas y procesos diferentes (210). MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma transcript 1), se ha identificado como un marcador de metástasis y supervivencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas (223). MALAT1 localiza en los speckles nucleares, un grupo de estructuras que regulan el procesamiento postranscripcional de los pre-mRNAs, donde se ha observado que participa en la regulación del splicing por la modulación de los niveles de los factores de splicing serina/arginina (224). HOTAIR puede localizar al complejo PRC2 y LSD1 a otros genes en Trans, y gracias a esta función regula la adquisición de un fenotipo metastásico en cáncer de mama y hepatocelular (198, 225).
5. **Inducción de angiogénesis:** Conforme la masa tumoral incrementa sus dimensiones, los vasos sanguíneos comienzan a ser insuficientes para la irrigación adecuada de las células tumorales, por lo que se comienzan a presentar regiones hipóxicas. Para continuar creciendo el tumor tiene que reactivar procesos de vasculogénesis y angiogénesis (210). Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización como VEGF-A (vascular endotelial growth factor A) (226). Un lncRNA que participa en el proceso de angiogénesis es aHIF, el NAT complementario al 3'UTR de HIF-1 $\alpha$ . Se ha observado que la sobreexpresión de aHIF induce la degradación del mRNA de HIF-1 $\alpha$ , y ambas moléculas constituyen un mecanismo de retroalimentación negativa (227). El transcrito antisentido de la eNOS (La óxido nítrico sintasa epitelial), llamado sONE o NOS3AS, regula la expresión de eNOS a nivel postranscripcional y reprime la expresión de eNOS en células no endoteliales (228, 229).
6. **Resistencia a la muerte celular:** La muerte celular programada, es un mecanismo que puede eliminar las células cancerosas en respuesta a distintos estímulos, como el daño al DNA (inducido por fármacos antineoplásicos como Cisplatino), y resulta común que las células cancerosas adquieran mecanismos para lograr evadir la apoptosis (210). PCGEM1 (prostate specific transcript 1) se sobreexpresa en tumores prostáticos responsivos a andrógenos, induce un retraso en la activación de p53 y p21, así como una disminución en la cantidad de Caspasa 7 cortada y PARP (230). PANDA (p21 associated ncRNA DNA damage activated), un lncRNA blanco de p53, al expresarse se une con NF-YA y lo secuestra, e impide así la inducción de varios genes proapoptóticos responsivos a este factor de transcripción (202).

Hasta el momento, se han descrito una gran cantidad de lncRNAs con funciones en cáncer, además de que varios de ellos pueden participar en la adquisición de más de un Hallmark por parte de las células cancerosas. Distintos estudios han demostrado que la expresión fuera de contexto de distintos lncRNAs puede causar cambios en el fenotipo celular tan profundos como ocurre con las proteínas oncogénicas o supresoras de tumor.

### **lncRNAs y el microambiente tumoral**

Gran parte del esfuerzo en el estudio de los lncRNAs con funciones biológicas relevantes en cáncer se ha enfocado en analizar la actividad biológica de estas moléculas en las células cancerosas aisladas del microambiente tumoral. Pocos estudios han investigado la participación de los lncRNAs en las redes de señalización que se dan entre las células tumorales y los distintos componentes de su microambiente. En esta sección, describiremos brevemente algunos de los estudios que han demostrado que los lncRNAs participan en la interacción de la célula cancerosa y su microambiente.

- ❖ **Matriz extracelular y lncRNAs:** El estudio del papel de los lncRNA en el “crosstalk” que se da entre la célula cancerosa y la matriz extracelular (ECM) aún ha sido pobremente estudiada. HOTAIR se ha asociado con la adquisición de un fenotipo metastásico en cáncer de mama (198). Sin embargo, la línea altamente metastásica MDA-MB-231 presenta una baja expresión de HOTAIR cuando se crece

en monocapa. Pero cuando MDA-MB-231 se cultiva en 3D utilizando una ECM rica en laminina (IrECM 3D) se observa un incremento en la expresión de HOTAIR, el cual requiere una señalización a través de integrina  $\alpha 2$  y Src. La interacción con esta proteína de la ECM conduce a la expresión de una nueva isoforma de HOTAIR, HOTAIR-N, la cual tiene un efecto pro-invasivo en líneas claudin-low como MDA-MB-231 (231, 232).

- ❖ **Fibroblastos asociados a cáncer (CAF's) y lncRNAs:** En cáncer de ovario, se ha observado que los CAF's participan en la metástasis gracias a la secreción de CXCL14. CXCL14 causa la inducción de LINC00092 en las células tumorales, el cual a su vez interactúa con la enzima glucolítica PFKFB2, reprograma el metabolismo energético y promueve el fenotipo metastásico (233). En carcinoma oral escamoso (OSCC) los CAF's secretan un factor de crecimiento llamado Midkine (MK), el cual se ha asociado con la resistencia a cisplatino. Este factor de crecimiento induce la sobreexpresión de ANRIL, el cual induce la expresión de los transportadores MRP1 y ABCC2 (234). En cáncer de mama la expresión de HOTAIR también es responsiva a señales provenientes de los CAF's, ya que la secreción de TGF- $\beta$  por los CAF's induce la expresión de HOTAIR vía la unión de SMAD2/3/4 su promotor (235). En cáncer de ovario, la comparación de los perfiles transcripcionales de CAF's con fibroblastos normales, descubrió un conjunto de 39 lncRNAs asociados con el fenotipo de los CAF's y se observó que se asociaban con el fenotipo promotor de metástasis de los CAF's (236). Utilizando una estrategia semejante, pero con una cohorte menor y en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLCs), se encontraron 766 lncRNAs que se asocian con el fenotipo de los CAF's, pero la predicción por correlación reveló que se asociaban con la regulación de la respuesta inmune (237).
- ❖ **Macrófagos asociados al tumor (TAM's) y lncRNAs:** En cáncer de ovario se observó que los macrófagos M2 reclutados al tumor secretan EGF, lo que conduce a un incremento en la proliferación, migración e invasividad. La señalización a través de EGF/EGFR condujo a una disminución en la expresión del lncRNA LIMT (lncRNA inhibiting metástasis), el cual es un inhibidor de la EMT (238). En cáncer de vejiga, la metástasis a ganglios linfáticos se asocia con la sobreexpresión del lncRNA LNMAT1 (lymph node metástasis associated transcript 1). LNMAT1 promueve metástasis a ganglios porque induce la expresión de CCL2. La secreción de CCL2 recluta macrófagos al sitio del tumor, los cuales secretan VEGF-C (239). MALAT1 se ha asociado con la capacidad pro-tumorigénica de los TAMs, el cual induce la secreción de factores pro-tumorigénicos como FGF por parte de TAM's (240). El lncRNA NIFK-AS1 se expresa en macrófagos de cáncer endometrial, donde se ha observado que la disminución en la expresión de NIFK-AS1, causa un incremento en la expresión de miR-146a y por consiguiente un bloqueo en la polarización M2 mediada por IL-4, un fenotipo inmunosupresor (241).
- ❖ **Linfocitos infiltrantes:** Los tumores desarrollan mecanismos que les permite evadir la eliminación por el sistema inmune (242). lnc-EGFR participa en la adquisición de un fenotipo inmunosupresor en los linfocitos infiltrantes de cáncer hepatocelular. lnc-EGFR, se sobreexpresa en linfocitos T de tumores hepatocelulares e induce un fenotipo Treg y reprime la diferenciación a linfocitos T citotóxicos gracias a que mantiene activa la señalización a través de EGFR y la función del eje AP-1/NF-AT1 (243). lnc-Sox5 se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal, y regula la infiltración de linfocitos citotóxicos CD3+CD8+T a través de la indolamina 2,3 dioxigenasa (244). lnc-Tim3 es otro lncRNA expresado en linfocitos infiltrantes CD8 de carcinoma hepatocelular, la expresión de lnc-Tim3 induce el agotamiento de linfocitos citotóxicos CD8 y la aparición de un microambiente inmunosupresivo (245). NKILA, es un lncRNA inducido por distintas vías proinflamatorias y que regula negativamente la vía de NF- $\kappa$ B. Su expresión en linfocitos T citotóxicos y Treg Th1 de tumores mamarios y de pulmón inhibe la señalización por NF- $\kappa$ B e induce un fenómeno conocido como muerte celular inducida por activación (AICD) (246).
- ❖ **Hipoxia:** Existen una gran cantidad de reportes que han descrito la función de lncRNAs en la respuesta y adaptación de las células cancerosas a la hipoxia presente en el tumor. Incluso HIF-1 y HIF-2 regulan la expresión de una gran cantidad de lncRNAs (247). El primer lncRNA regulado por hipoxia que se describió fue H19, en cáncer de vejiga. La hipoxia incrementa la expresión de H19, el cual a su vez regula la expresión de Kip2 y FGF18 (248). El gen HIF1 $\alpha$  presenta dos lncRNAs antisentido, uno en posición 5' (5'asHIF-1 $\alpha$ ) y otro en posición 3' (3'asHIF1 $\alpha$ ) y ambos pueden regular la expresión de su gen hospedero (249). lncRNA-LET usualmente presenta una expresión baja en

distintos tumores, debido a que la activación hipóxica de HDAC3 lo reprime. La inhibición de lncRNA-LET causa la estabilización de la proteína NF-90, la cual participa en la adquisición de un fenotipo invasivo (250). linc-ROR se sobreexpresa en células cancerosas en hipoxia e induce la supervivencia debido a la inhibición de miR-145. linc-ROR se secreta en vesículas de las células hipóxicas y puede transferir el fenotipo hipóxico a células en condiciones normales (251). HIF1 $\alpha$  regula directamente a LINK-A, este lncRNA sirve como molécula de andamiaje para la formación de un complejo de señalización en la membrana citoplásmica que induce el mantenimiento del fenotipo hipóxico y la estabilización de HIF-1 $\alpha$  incluso en condiciones normóxicas, es decir, cuando la hipoxia ya fue resuelta por una neovascularización (252).

Los lncRNAs son moléculas reguladoras clave que participan en las complejas redes de regulación que se dan entre las células tumorales y su microambiente, además de que participan en la adquisición de rasgos fenotípicos más agresivos por parte de las células cancerosas en respuesta a un microambiente específico. Por esta razón se considera que el microambiente presente en los MCTS de cáncer de mama inducirá la expresión de diversos lncRNAs que a su vez mediarán la adquisición de rasgos fenotípicos de mayor agresividad por parte de las células tumorales.

## CAPÍTULO II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

### HIPOTESIS.

Los lncRNAs regulan los cambios transcripcionales y fenotípicos que conducen a la adquisición de rasgos más agresivos, en respuesta al microambiente de un esferoide multicelular tumoral.

### OBJETIVOS.

Determinar la participación de lncRNAs expresados diferencialmente en MCTS de la línea MCF-7 en la adquisición de rasgos fenotípicos más agresivos como respuesta al microambiente del esferoide.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✓ 1.- Seleccionar un lncRNA cuya expresión cambió en esferoides de todas las fases.
- ✓ 2.- Analizar qué cambios en el microambiente (hipoxia, pH y agregación) causan cambios en los niveles de expresión del lncRNA.
- ✓ 3.- Determinar que procesos celulares (proliferación, población de progenitores, migración, sensibilidad a muerte) son regulados por el lncRNA utilizando ensayos de pérdida de función.
- ✓ 4.- Analizar el posible mecanismo de regulación del lncRNA.



## CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Estrategia experimental.**

Brevemente, del grupo de 76 lncRNA cuya expresión cambió durante todo el cultivo en forma de esferoide se seleccionó un lncRNA que fue nombrado lncRNA-HAL. La estrategia que se siguió para este fin se discute detalladamente en la sección de resultados. Se demostró mediante RT-qPCR la sobreexpresión de lncRNA-HAL en los esferoides y se estudió que variables microambientales (hipoxia y acidosis) son las responsables de esta sobreexpresión. Posteriormente se separaron mediante citometría de flujo y microdissección laser las diferentes poblaciones de los MCTS y se determinó la expresión de lncRNA-HAL en cada población.

Con el fin de estudiar la función biológica de lncRNA-HAL se generó un modelo de pérdida función mediante shRNAs. En este modelo se evaluó el efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre el transcriptoma de las células MCF-7 mediante un ensayo de RNA-seq. A partir de los resultados obtenidos del ensayo de RNA-seq se comprobó el cambio en la expresión de distintos genes mediante RT-qPCR, y el efecto sobre ciertas características celulares se evaluó mediante ensayos de biología celular y molecular como: Curvas de crecimiento, perfiles de ciclo celular, ensayos de migración e invasión, citometría de flujo de distintos marcadores de superficie y ensayos para estudiar el fenotipo de CSC.

Posteriormente, con el fin de sugerir una posible vía de señalización a través de lncRNA-HAL se identificaron las proteínas que interactúan con este transcrito. Para esto se realizó un ensayo de aislamiento de cromatina mediante purificación de RNA (Chromatin Isolation by RNA purification, ChIRP), en el cual se precipitó a lncRNA-HAL, con sus proteínas unidas, usando un juego de sondas biotiniladas. La identidad de las proteínas purificadas se analizó mediante espectrometría de masas. Este ensayo nos permitió identificar las proteínas que interactúan con lncRNA-HAL en las células MCF-7.

### **Cultivo celular en monocapa.**

La línea celular MCF-7, proveniente de un carcinoma mamario humano, se cultivó en medio RPMI 1640 (Cellgro, no. cat. 10-040, MA, USA) con 5% de Suero fetal bovino (SFB) en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM (Cellgro, no. cat. 10-013, MA, USA) suplementado con 10% de SFB en condiciones estándar de cultivo. Las curvas de crecimiento para MCF-7 se realizaron con una siembra inicial de 5x10<sup>4</sup> células en cajas Petri de 35mm, el conteo celular se realizó diariamente durante 4 días.

### **Cultivo de esferoides.**

Los esferoides de la línea celular MCF-7 se generaron utilizando una técnica modificada del "líquido sobrelapante". Células en monocapa con no más de tres pases de cultivo se tripsinizan (0.025% de tripsina/1mM EDTA/1x PBS) durante 5 minutos a 37°C y se centrifugan a 2100 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se siembran 2x10<sup>6</sup> células en frascos de 12.5 cm para cultivos en suspensión en medio Leibovitz's L-15 (Cellgro no. cat. 10-045-CV, MA, USA). Los cultivos se incuban en agitación orbital de 60 rpm a 37°C. Cada dos días se realizó cambio de medio y los agregados celulares amorfos se removieron. La curva de crecimiento de los esferoides se realizó midiendo diariamente los diámetros de 30 esferoides en un microscopio invertido Axio Scope A1(Carl Zeiss, Jena, Germany) utilizando el software AxioVision versión 4.8.2.0.

### **Silenciamiento del lncRNA-HAL mediante shRNAs.**

Los shRNAs para el lncRNA-HAL se diseñaron utilizando el algoritmo e-RNAi. Las secuencias seleccionadas son las siguientes:

shlncRNA-1

gatccGAGACAGGCAGAATCAAGATTCAAGAGATCTTGATTCTGCCTGTCTCT TTTTACGCGTg

shlncRNA-2

gatccGCGAAACTCTGTTGGAAAATTCAAGAGATTTTCCAACAGAGTTTCGCT TTTTACGCGTg

Los oligonucleótidos se alinearon en un termociclador (95°C durante 30 seg, 72°C durante 2 min, 37°C durante 2 min y 25°C durante 2 min) y posteriormente se clonaron en el vector pSIREN-RetroQ (Clontech, CA, USA), previamente digerido con BamHI y EcoRI. Para la transfección del plásmido se utilizó el agente de transfección X-Fect (Cat. 631317 Clontech laboratories, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para generar transfecciones estables, las células se seleccionaron con puomicina 0.6 ug/ml durante 7 días. Posteriormente, se eligieron las tres clonas con la menor expresión del lncRNA-HAL. De estas tres clonas se hizo un “pool” de los shRNA utilizados y se les asignó el nombre de shlncRNA-HAL1 y shlncRNA-HAL2.

#### **PCR en Tiempo Real (RT-qPCR)**

El RNA total se extrajo con TRIzol (Cat. 15596026, Thermo, MA, USA). El cDNA se sintetizó con 1 µg del RNA total utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Cat. 4368813, ThermoFisher, MA, USA).

Las secuencias de los primers utilizados para el PCR se muestran en el apéndice 1.

El PCR en Tiempo Real se realizó utilizando SYBR Select Master Mix (Cat 4472, Thermo, MA, USA) con las siguientes condiciones: paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto.

#### **Condiciones de hipoxia, acidosis y privación de suero.**

Para los ensayos de hipoxia, los cultivos en monocapa de la línea MCF-7 a confluencia del 70% se transfirieron a una cámara de hipoxia Bactrox hipoxia chamber, 13.7 Cu.Ft. 388L (Chel Lab, OR, USA) en donde se ajustaron los niveles de oxígeno a 1%, 0.5% y 0.1% durante 24hrs. Para los ensayos de sobrevivencia, se sembraron 10,000 células (shl lncRNA-HAL y shLuc) en placas de 96 pozos y se incubaron en las diferentes condiciones de hipoxia. Después de 24 horas, la viabilidad celular se analizó mediante un ensayo de MTS utilizando el kit Cell titer 96 Aqueous Non-radioactive cell proliferation assay (G5430, Promega, WI, USA).

Para los ensayos de acidosis se utilizó medio RPMI 1640 con HEPES (35mM) al que se le ajustó el pH a 7.4, 6.9, 6.7 y 6.5 con HCl. Las células MCF-7 en monocapa (shHAL and shLuc) a confluencia del 70% se incubaron con estos medios ácidos durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo.

Para los ensayos de privación de suero, se sembraron 5,000 células (shHAL and shLuc) en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB. Posteriormente, el medio se reemplazó por medio sin suero y sin rojo

fenol. Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones durante 5 y 7 días, renovando el medio de cultivo cada 2 días.

### **Ensayos de citometría celular.**

Para el análisis de inmunofenotipificación celular con CD44/CD24, las células MCF-7 cultivadas en monocapa se tripsinizaron y se contaron. Se tiñeron  $1 \times 10^6$  células con anti-CD44-FITC (1:10) (130-095-195) (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) y anti-CD24-PE (1:5) (555428) (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) durante 30 minutos. Posteriormente,  $5 \times 10^4$  eventos se analizaron en un citómetro FACS Aria (Becton Dickinson, CA, EUA).

La separación de las subpoblaciones celulares de los esferoides MCF-7, se realizó a partir de MCTS de 20 días de cultivo que se disgregaron con 3ml de acutasa a 37°C y agitación orbital de 60 rpm durante 45 minutos, seguido de 2 minutos de tripsina 0.025% y disgregación mecánica.  $2 \times 10^6$  de las células obtenidas se fijaron con PFA 4% (Paraformaldehído 4%) durante diez minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol frío a una concentración final del 90% por treinta minutos en hielo. Posteriormente, las células se tiñeron con los anticuerpos primarios conjugados Ki-67 (Alexa® 488, 11882S, cell signaling technology, USA) y p27Kip1 (PE, 12184S, cell signaling technology, USA) durante una hora a temperatura ambiente en buffer de bloqueo (PBS con NaCl 2M y BSA 0.5%) para mantener la integridad del RNA. Las poblaciones celulares se separaron en un Citómetro FACSAria y se colectaron en PBS con NaCl 4M y 1% BSA para evitar la degradación del RNA. El RNA se extrajo utilizando el kit miRNeasy FFPE siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando 240 µl de buffer PKD. La expresión de genes en las distintas poblaciones del esferoide se realizó como se describe en la sección de qRT-PCR.

### **Separación por micro disección de las capas externas e internas de MCTS de MCF-7.**

Los esferoides de 20 días de cultivo se lavaron en PBS, se fijaron en paraformaldehído 4% y se embebieron en parafina para realizar cortes de 10 micras. Los cortes fueron montados en portaobjetos y después desparafinados. Se realizó la separación de las capas celulares externas positivas al marcador Ki67 y de las capas celulares internas positivas al marcador P27. La micro disección se realizó de manera circular a una distancia de 45-50 µm de la periferia en 122 MCTSs con diámetros de 350-420 µm utilizando un microdisector láser (P.A.L.M. Microlaser. Carl Zeiss MicroImaging. Bernreid, Germany, GmbH). Las condiciones utilizadas para la micro disección fueron las siguientes: Velocidad de 20, Energía de 68 y Foco de 83. Después del corte, cada una de las poblaciones se recolectaron manualmente en 500 µl de RNAlater y el RNA se extrajo utilizando el kit miRNeasy FFPE como se mencionó en la sección anterior.

### **Análisis de Transcriptoma completo por RNA-seq**

El RNA de  $5 \times 10^6$  células se extrajo utilizando TRizol (Cat. 15596026, Thermo, MA, USA). El RNA ribosomal se eliminó con el kit Ribo-Zero rRNA Removal (Cat MRZH116, Illumina, CA, USA). Las librerías de cDNA se construyeron con el kit TruSeq Stranded total RNA library prep (RS-122-2201, Illumina, CA, USA). Posteriormente, las librerías obtenidas se cuantificaron por fluorimetría (Qubit fluorometer, Invitrogen) y se secuenciaron en el NextSeq 500 (Illumina, CA, USA). Una vez que las lecturas se curaron, los datos de RNA-seq se mapearon en el genoma humano utilizando el software Star aligner. La expresión diferencial de genes se calculó mediante análisis empíricos utilizando al algoritmo EdgeR. Los análisis de vías y procesos biológicos relacionados con la expresión diferencial de genes se realiza con el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

### **Ensayos de TUNEL y Ciclo celular.**

Para los ensayos de TUNEL y ciclo celular, se crecieron cultivos en monocapa de las células MCF-7 shLuc y las células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL. 96 horas después, las células se tripsinizaron y  $2 \times 10^6$  células se fijaron con para formaldehído 1% durante 15 minutos en hielo y se permeabilizaron con etanol 70% (v/v) durante 45 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las células se tiñeron con el kit APO-BrdU TUNEL Assay (A23210, Thermo, MA, USA) con una primera incubación de una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  con la enzima TdT y el BrdUTP, seguida de la incubación con el anticuerpo anti-BrDU/Alexa Fluor 488 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la tinción con yoduro de propidio se realiza durante 30 minutos a temperatura ambiente. El ciclo celular y el ensayo de TUNEL se evaluaron de manera simultánea en un citómetro FACSaria (BD, CA, EUA) registrando por lo menos 20000 eventos por muestra. Los datos obtenidos se analizaron con el software ModFit para el perfil de ciclo celular y con FlowJo para el TUNEL. (Systems, California, USA).

### **Ensayos de migración y degradación de gelatina fluorescente.**

Los ensayos de migración se realizaron utilizando Cámaras de Boyden. Las células se privaron de suero y rojo fenol 24 horas antes del ensayo, posteriormente se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células en los insertos de la cámara (poro de  $0.8 \mu\text{m}$ , catálogo 3422, Corning, NY, USA) en RPMI 1640 sin SFB. Como quimioatrayente se utilizó en el pozo inferior de la cámara RPMI 1640 suplementado con 15% de SFB. Las células se incubaron 24 horas en este sistema y después las células que no migraron se retiraron mecánicamente con un hisopo mientras que las células que migraron se fijaron con PFA (Para-formaldehído) 4% y se tiñeron con cristal violeta. Las células teñidas se contaron en un microscopio estereoscópico.

### **Ensayo de clonogenicidad en agar suave.**

Para el ensayo de formación de colonias se mezclaron  $5 \times 10^3$  células MCF-7 shLuc y MCF-7 lncRNA-HAL silenciadas en medio DMEM con agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.3%. La mezcla se colocó en placas de 6 pozos previamente recubiertos con agarosa LMP al 0.5% con DMEM. Después de 28 días de cultivo, las colonias formadas se tiñeron con 1 ml de cristal violeta 0.1% y se contaron con el software ImageJ.

### **Ensayo de formación de mamoesferas.**

Para generar esferoides clonogénicos se sembraron  $2 \times 10^4$  células en frascos de cultivo en suspensión con medio Mammocult (Cat 05620, StemCell Technologies, BC, Canadá) suplementado con  $0.48 \mu\text{g/ml}$  de hidrocortisona y  $4 \mu\text{g/ml}$  de heparina. El diámetro de los esferoides se midió diariamente y a los 7 días de cultivo se contaron hacienda uso de un microscopio estereoscópico.

### **Expresión del lncRNA-HAL en muestras de cáncer de mama.**

Los datos de RNAseq se obtuvieron del SRA (GEO Project GSE58135). Los archivos fastq de 56 muestras normales y 84 muestras tumorales (42 positivas a RE y 42 triple negativas) se filtraron y se alinearon con el ensamblaje del genoma humano GRCh38 utilizando el algoritmo STAR. Los datos crudos se normalizaron, cuantificaron y se utilizaron para el análisis de expresión diferencial mediante RSEM/EBSeq.

### **Ensayo de xenotrasplantes en peces Zebra.**

Los peces zebra de tipo “wild type” o silvestre se crecieron en condiciones estándar (Temperatura:28.5°C, PH:7.2-7.4, Ciclos de luz-oscuridad:12-12). Los huevos fertilizados se obtuvieron de cruza naturales. Dos días después de la fertilización (dpf) los embriones fueron descorionizados y anestesiados con triciana (MS-222; Sigma, México). Para el xenotrasplante se utilizó una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml de MCF7-Luc, MCF7-ShRNA-HAL-1 y MCF7-ShRNA-HAL-2. La mezcla de las células se cargó en una aguja de vidrio de borosilicato utilizando el extractor Flaming/Brown micropipette. En cada embrión se implantaron de 5-10 nanolitros de la suspensión de células (200, 300 y 500 células) y la implantación se realizó en el saco vitelino de los embriones mediante inyección única utilizando un microinyector de aire-presión regulado electrónicamente. Después de la inyección, los embriones se lavaron y se mantuvieron a 34°C. El monitoreo de los embriones se siguió durante cinco días después de la inyección (dpi) para evaluar la formación de tumores. La proporción de individuos que formaron tumor en cada grupo se tomó como la capacidad de las células inyectadas para formar tumor.

#### **Ensayo de aislamiento de cromatina por purificación de RNA (ChIRP).**

El experimento de ChIRP se realizó de acuerdo al protocolo publicado previamente por el laboratorio de Chang (253). Brevemente, se diseñaron un juego de 28 sondas biotiniladas (20 nucleótidos) separadas por entre 60-80 nucleótidos y que hacen blanco en secciones subsecuentes cada 100 nucleótidos del transcrito del lncRNA-HAL. Como control negativo se utilizaron 2 sondas que cubren el mRNA de HPRT (Apéndice 2). Las sondas contra lncRNA-HAL se dividieron en dos mezclas, nones (aquellas que quedaban en secciones como 1-100, 300-400) y pares (en regiones como 200-400,400-600). Primero, se cosecharon 80 millones de células para los experimentos de precipitación de lncRNA-HAL y HPRT, los cuales se lisaron y se sonicaron usando un sonicador Vibracell (Sonic and materials, CT, USA) durante una hora a un 70% de amplitud. El transcrito de lncRNA-HAL y las proteínas con las que interactúa fueron precipitados con una de las dos mezclas de sondas y con perlas magnéticas con estreptavidina (MyOne Streptavidin Magnetic Beads, Invitrogen, CA, USA). De las precipitaciones se tomaron 20uL para aislar RNA y el resto para aislar proteínas. El RNA se aisló utilizando TRIzol, mientras que las proteínas se eluyeron hirviendo las perlas magnéticas en buffer laemmli 1X durante 15 minutos (dos veces). El enriquecimiento de lncRNA-HAL en las muestras de RNA se validó mediante RT-qPCR, mientras que las proteínas inicialmente se analizaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con nitrato de plata. Las proteínas se identificaron mediante el análisis por espectrometría de masas. Las proteínas que se consideraron como unidas a lncRNA-HAL, fueron aquellas que no se aislaron en el control de HPRT y que estaban presentes en los dos juegos de sondas para lncRNA-HAL y en las tres réplicas biológicas realizadas.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

### Selección de lncRNA-HAL para su estudio.

Como se había comentado previamente, el modelo de MCTS es un modelo de cultivo tridimensional que permite incorporar a un sistema *in vitro* diversas variables microambientales. Cuando se analizó el impacto que tenía este sistema de cultivo en el transcriptoma de la línea MCF7 en comparación con un control en monocapa, se observó que el cultivo en MCTS traía consigo un cambio importante en el perfil de expresión génica. Un fenómeno interesante es que además de observarse un cambio importante en la expresión de una gran cantidad de mRNAs también se presentó un cambio importante en la expresión de una gran cantidad de lncRNAs (72, 104, 133). Un fenómeno interesante fue el hecho de que ciertos lncRNAs (33 lncRNAs) se expresaron específicamente en las primeras fases del desarrollo de los MCTS cuando el diámetro de los esferoides no alcanza a generar regiones francas de hipoxia y acidosis. Así mismo, hay un grupo de lncRNAs (16 lncRNAs) cuya expresión es específica de las fases tardías de desarrollo del esferoide en las que la hipoxia y la acidosis están presentes, así como una mayoría de células no proliferantes. Sin embargo, un fenómeno interesante fue el hecho de que un grupo de lncRNAs (76 lncRNAs) incrementaron o disminuyeron su expresión en todas las fases de desarrollo de los esferoides lo cual sugiere que la expresión de este grupo de transcritos resulta de suma importancia para el fenotipo de mayor agresividad que se observa en el cultivo en forma de MCTS.

Para reducir el número de lncRNAs a un grupo analizable decidimos seleccionar ciertas variables con el fin de enfocarnos en aquellos transcritos que pudiesen tener una mayor relevancia biológica. La primera variable analizada, fue la capacidad de producir un transcrito que no codificara para una proteína. Para esto se utilizaron tres algoritmos bioinformáticos: 1) “coding potential calculator” (CPC), el cual analiza la presencia de ORF’s, el nivel de homología con secuencias codificantes y la presencia de dominios proteicos conservados (254). 2) análisis de homología con la base de datos de dominios proteicos Pfam (255). 3) El algoritmo PhyloCSF que evalúa la frecuencia de sustitución de codones de una secuencia entre distintas especies, lo que permite determinar si la tasa de cambio corresponde a secuencias codificantes (usualmente más conservadas) (256). Este análisis nos permitió seleccionar aquellos transcritos que no codificaran para péptidos o proteínas, pero también con certeza de que se transcriben y presentan cierto grado de conservación.

Después se utilizó el valor de Fold Change de los resultados de expresión diferencial entre MCTS y monocapa. Se retiraron de los análisis aquellos transcritos en los que sólo en una muestra biológica se observara el cambio fuerte en la expresión. Los transcritos restantes, se les asignó un valor de arbitrario de 0 para Fold Change menores a 5 veces, de 1 para valores entre 5 y 10 veces y de 2 para valores superiores a 10. Posteriormente se evaluó la localización de los genes y su relación con otros genes codificantes, dando valores arbitrarios de 0 para genes que se traslaparan con regiones codificantes, genes que sólo se traslapan con regiones codificantes en pequeñas regiones y de 2 para genes intergénicos que no se solaparan con regiones codificantes. Después, se evaluó que se pudieran diseñar primers y shRNAs contra esa secuencia, dando valores de 0 para secuencias que no permitieran ambos diseños, de 1 para aquellas que permitieran diseñar uno de los dos y de 2 para secuencias que permitieran el diseño de ambos. Finalmente se realizó un análisis preliminar de su asociación con el fenotipo tumorigénico, para esto se utilizó una base de datos de transcriptoma de tumores mamarios, y de tejido sano (257). En este caso se asignó un valor arbitrario de 2 para aquellos transcritos que cuya expresión tuviera una asociación estadísticamente significativa con la enfermedad, y de 1 para aquellos transcritos cuya expresión se correlacionara con la enfermedad,

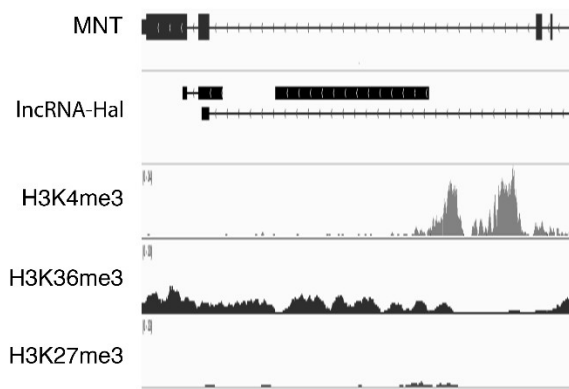
pero sin significancia estadística. En la Tabla 1 se muestran los lncRNAs más destacados y los valores asignados a cada uno de los criterios aplicados.

Tabla 1. Criterios de selección y puntajes asignados a los lncRNAs							
lncRNA	FCh	Puntaje FCh	Puntaje Genes Vecinos	Puntaje Primers y shRNAs	Asociación Cáncer de mama	Puntaje Asociación	Sumatoria
lnc-Mat2B	6	1	2	2	Normal vs TNBC	2	7
lnc-Nav1	5	1	1	2	Normal vs TNBC	2	6
lnc-AC006435	6	1	1	2	InSitu vs Invasivo	2	6
lnc-NPB	10	2	0	0	NA	1	2
lncRUNDC3A	5	1	0	0	NA	1	1
lnc-Sp6	1.8E+308	2	0	1	NA	1	3
lnc-Gas5	1.8E+308	2	0	1	NA	1	3
lnc-SYK3	6	1	0	0	NA	1	1
lnc-CTD-2517	1.8E+308	2	0	1	NA	1	3
lnc-NACA2	-22	2	0	1	NA	1	3
lnc-CLEC2A	1.8E+308	2	0	1	NA	1	3
lnc-SLC7A13	-5	1	0	1	NA	1	2
lnc-PKD1	-1.00E+01	2	0	1	NA	1	3

Al utilizar los criterios y puntajes descritos previamente se seleccionaron dos lncRNAs para continuar con la descripción de su función biológica en el fenotipo tumorigénico de la línea MCF-7. Estos dos lncRNAs son lnc-Mat2B y lnc-AC006435, que se llamará de ahora en adelante “Hypoxia Activated lncRNA” (lncRNA-HAL). Para motivos del presente escrito, se describirá el estudio que se realizó sobre la función de lncRNA-HAL en el fenotipo canceroso de la línea MCF-7.

### Características de lncRNA-HAL

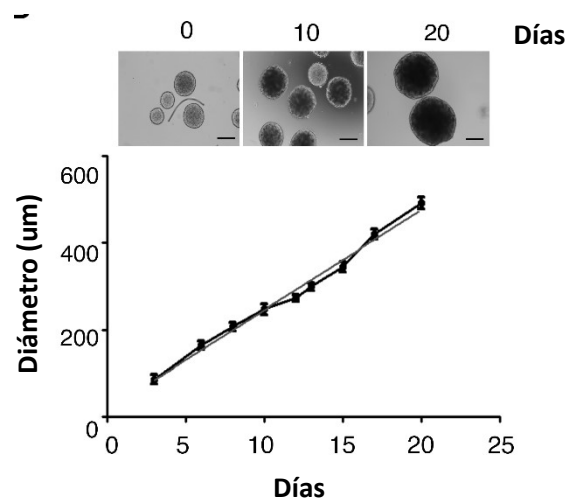
lncRNA-HAL es un gen intrónico que se localiza en el primer intrón de del gen MNT, el cual es un regulador negativo del factor de transcripción Max, que antagoniza la respuesta transcripcional de c-Myc (258). El análisis bioinformático de las marcas de cromatina reportadas por el proyecto ENCODE en el gen de lncRNA-HAL, mostró que el promotor putativo de lncRNA-HAL presentaba la marca de activación transcripcional H3K4me3 delimitada en la región de inicio de la transcripción. Así mismo, otra marca que sugiere transcripción activa de un gen que es la H3K36me3 se observa enriquecida en la región que se transcribe del gen de lncRNA-HAL Figura 6. Estos datos sugieren que lncRNA-HAL es una unidad transcripcional independiente del gen MNT, que cuenta con su propio promotor y se expresa activamente en la línea MCF-7.



**Figura 6. Características genómicas del gen lncRNA-HAL.** Se muestra en la parte superior el intrón del gen MNT donde se localiza el gen lncRNA-HAL. En la segunda sección se muestra la localización del único exón del gen lncRNA-HAL. Posteriormente se muestra la localización de la marca de cromatina abierta H3K4me3 en la región promotora de lncRNA-HAL, datos de CHIP-seq procedentes de ENCODE. Así mismo, se muestra otra marca de cromatina abierta H3K36me3 en el cuerpo del gen. Finalmente, se muestra la localización de la marca de represión H3K27me3 en la línea MCF-7.

### Evaluación de la expresión de lncRNA-HAL en esferoides de la línea MCF-7.

Con el fin de determinar si la expresión de lncRNA-HAL se correlaciona con el microambiente generado en los MCTS se decidió validar el incremento en la expresión observado en los experimentos de RNA-seq mediante qRT-PCR en distintos tiempos del desarrollo de los esferoides. Para esto lo primero que se realizó fue un análisis de la cinética de crecimiento de los esferoides de la línea MCF-7 con el fin de evaluar si la cinética era semejante a los datos reportados por Muñoz-Galindo et al., (133) Los resultados obtenidos muestran una cinética de crecimiento lineal que concluye a los días 20 con un diámetro de entre 400-450um (Figura 7).

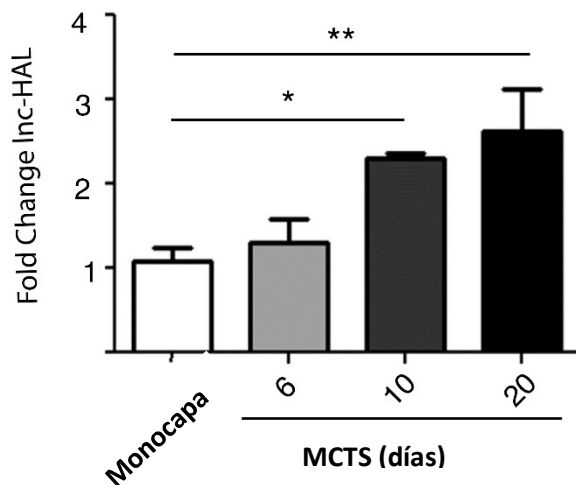


**Figura 7. Curva de crecimiento de esferoides de la línea MCF-7.** Gráfica que mide el crecimiento de los esferoides (diámetro um) en función del tiempo en días. En la parte superior se muestran imágenes representativas de los esferoides a distintos puntos del desarrollo.

Una vez validada la reproducibilidad del sistema de cultivo de los MCTS se evaluó la expresión de lncRNA-HAL en esferoides de 6, 10 y 20 días de cultivo y utilizando un control de células MCF-7 en monocapa con un 100% de confluencia. Se decidieron evaluar estos tiempos de cultivo, dadas las características de cada uno. Los esferoides de 6 días, debido a su diámetro pequeño la difusión de oxígeno no se ve limitada en las zonas internas del esferoide, el microambiente está dado principalmente por una matriz extracelular compleja y las interacciones intercelulares tridimensionales. Los esferoides de 10 días, dado su diámetro de aproximadamente 250um, comienzan a generar regiones de hipoxia, además de las características previamente mencionadas. En tanto que los esferoides de 20 días que ya presentan un diámetro máximo ya presentan hipoxia, acidosis, un centro aponecrótico, y una gran proporción de células en estado quiescente. Los resultados obtenidos mostraron que lncRNA-HAL no muestra un incremento en su expresión en los



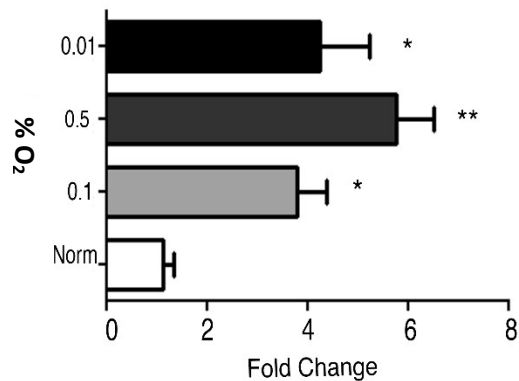
esferoides de 6 días con respecto a monocapa, sin embargo, en los días 10 y 20 se observó un incremento en los niveles de lncRNA-HAL con respecto a monocapa (Figura 8).



**Figura 8. Expresión de lncRNA-HAL en esferoides de 6, 10 y 20 días.** Evaluación de la expresión de lncRNA-HAL en MCTS de 6, 10 y 20 días mediante RT-qPCR y comparado contra un control de células MCF-7 crecidas en Monocapa. Análisis estadístico mediante t de student, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

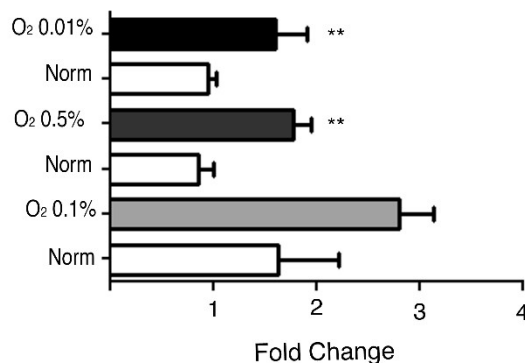
#### Efecto de la hipoxia y acidosis en la expresión de lncRNA-HAL.

El resultado obtenido que mostró que lncRNA-HAL se expresaba principalmente en esferoides tardíos nos hizo preguntarnos si sería posible que la hipoxia y acidosis que se presentan en esta fase de crecimiento de los esferoides podría ser responsable del incremento en la expresión de este transcrito. La primera condición microambiental que se decidió evaluar fue la hipoxia, para esto se colocaron células MCF-7 crecidas en monocapa dentro de una cámara de hipoxia, la cual nos permitió modificar la concentración de oxígeno atmosférico hasta un nivel de hipoxia leve (1%  $O_2$ ), moderado (0.5% de  $O_2$ ) y severo (0.1%  $O_2$ ). La medición de los niveles de transcrito de lncRNA-HAL mediante RT-qPCR, mostró que su expresión incrementaba en las tres condiciones de hipoxia analizadas (1%, 0.5% y 0.1% de  $O_2$ ), en comparación con un control en normoxia (20% de oxígeno) (Figura 9). Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de lncRNA-HAL, responde a diferentes intensidades de hipoxia.



**Figura 9. Expresión de lncRNA-HAL en diferentes condiciones de hipoxia.** Análisis de la expresión de lncRNA-HAL en condiciones de hipoxia leve (1% O<sub>2</sub>), moderada (0.5% O<sub>2</sub>) y severa (0.1% O<sub>2</sub>), en comparación con un control de Normoxia (20% de O<sub>2</sub>). Análisis mediante RT-qPCR, análisis estadístico mediante t de student, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

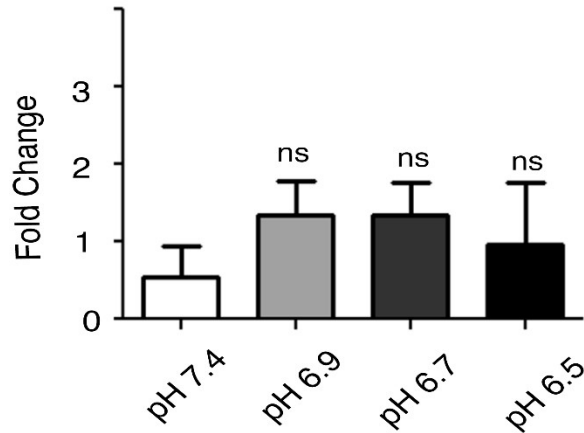
Además, con el fin de determinar si la expresión sensible a hipoxia de lncRNA-HAL es un fenómeno específico de la línea celular MCF-7 o bien se reproduce en otros tipos celulares de cáncer de mama. Decidimos realizar el mismo experimento, pero ahora en la línea celular MDA-MB-231, la cual es igualmente una línea de cáncer de mama, pero del subtipo triple negativo. En este experimento se observó que la expresión de lncRNA-HAL presentaba el mismo comportamiento en condiciones de hipoxia en ambas líneas (Figura 10).



**Figura 10. Expresión de lncRNA-HAL en condiciones de hipoxia en la línea MDA-MB-231.** Análisis de la expresión de lncRNA-HAL en células MDA-MB-231 en condiciones de hipoxia leve (1% O<sub>2</sub>), moderada (0.5% O<sub>2</sub>) y severa (0.1% O<sub>2</sub>). RT-qPCR, análisis estadístico t de student. \*p<0.5. \*\*p<0.01.

Posteriormente, dado que la hipoxia trae consigo el incremento en el metabolismo glucolítico y esto a su vez conduce a la acidificación del medio de cultivo, se decidió evaluar si la acidosis generada por la hipoxia podría contribuir al incremento en la expresión observada para este lncRNA. Para evaluar esto se decidió cultivar las células en medio con pH ácidos (6.5, 6.7 y 6.9), simulando así las condiciones de acidosis que podrían ocurrir en un tumor. Los datos que se obtuvieron mostraron que lncRNA-HAL no presenta cambios en su expresión a causa de una disminución en el pH del

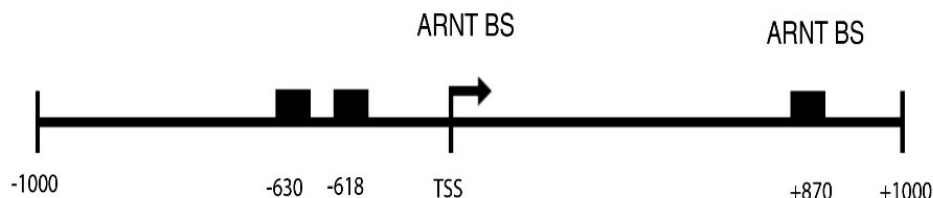
medio (Figura 11). Este resultado sugiere que la expresión de lncRNA-HAL es inducida únicamente por la disminución en la concentración de oxígeno y no por la disminución en el pH resultado de la respuesta a hipoxia.



**Figura 11. Expresión de lncRNA HAL en condiciones de acidosis.** Se determinó la expresión de lncRNA-HAL en células MCF-7 bajo tres condiciones de acidosis (6.5, 6.7 y 6.9), en comparación con un control con pH de 7.4. RT-qPCR, análisis estadístico t-student. ns  $p > 0.05$ .

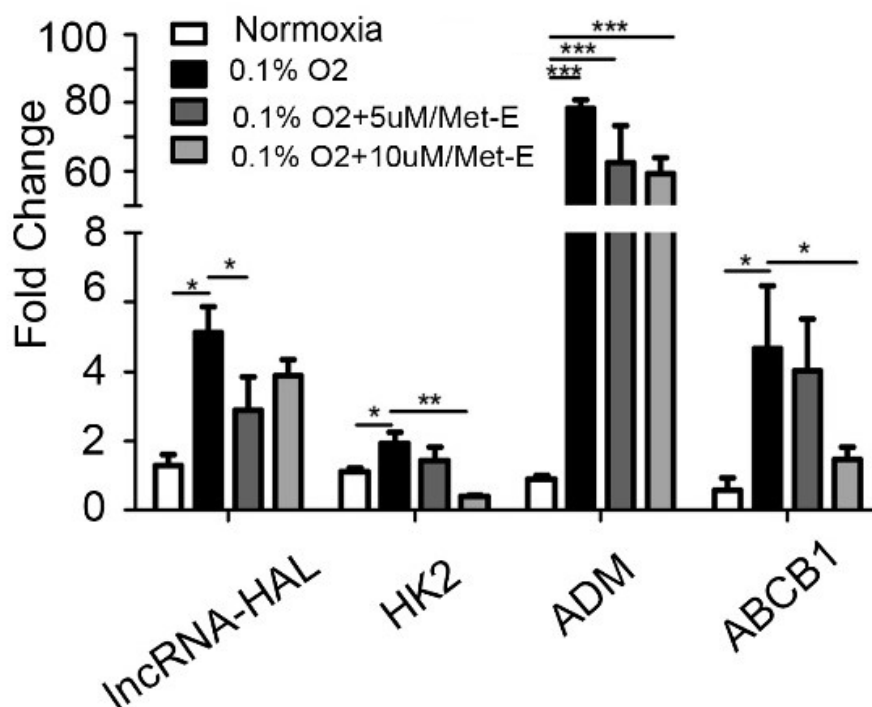
Los resultados obtenidos para ambos lncRNAs siguieron que estos dos transcritos se expresan en células MCF-7 en respuesta a condiciones microambientales específicas que se observan en esferoides de 20 días, como es la hipoxia. Estos resultados a su vez indican que la expresión de lncRNA-HAL podría estar relacionada con la población de células quiescentes que se encuentran en estos nichos hipóxicos.

Dado que HIF-1 $\alpha$ , es uno de los principales reguladores a nivel transcripcional de la respuesta celular a la hipoxia, decidimos evaluar mediante un abordaje bioinformático si el promotor de lncRNA-HAL presenta secuencias consenso de respuesta a HIF-1 (HRE, hipoxia response elements). Para esto se utilizó el software PROMO (259). El análisis reveló que el promotor de lncRNA-HAL presentaba tres secuencias consenso de unión a ARNT (también conocido como la subunidad  $\beta$  del dímero HIF-1) (Figura 12). Lo que indica que lncRNA-HAL puede tener elementos de respuesta a HIF-1 y ser regulado por este factor de transcripción en condiciones hipóxicas.



**Figura 12. Análisis del promotor de lncRNA-HAL.** Se analizó la presencia de elementos de respuesta a hipoxia (HRE's), en este caso representados como sitios de unión a ARNT (ARNT BS), en el promotor (-1000+1000) de lncRNA-HAL. Se utilizó la herramienta bioinformática PROMO

Para confirmar que la expresión de lncRNA-HAL estuviera regulada por la hipoxia, decidimos determinar el efecto de HIF-1 en la expresión de lncRNA-HAL. Para esto se colocaron células MCF-7 en condiciones de hipoxia severa (0.1% de O<sub>2</sub>) y se trataron con dos concentraciones de 2-o-metoxi-estradiol, un inhibidor farmacológico de HIF, el cual inhibe la translocación nuclear de HIF-1 a través de la polimerización de microtúbulos (260, 261). El efecto de la inhibición de HIF se evaluó midiendo los niveles de los mensajeros de tres genes blanco de HIF, HK2, ADM y ABCB1. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de 10uM de 2-o-metoxi-estradiol logró abatir significativamente la inducción por HIF de HK2 y ABCB1 y mostró su dependencia de HIF bajo condiciones de hipoxia. En cambio, el gen ADM, que mostró niveles altos de expresión en hipoxia, no presentó cambios significativos en su expresión derivados del tratamiento con 2-o-metoxi-estradiol. Estos resultados sugieren que, a pesar de ser genes blancos, ampliamente reportados, de HIF-1, la respuesta transcripcional de cada gen a la inhibición resulta bastante específica del gen en cuestión. En el caso de lncRNA-HAL, los resultados mostraron que la expresión en hipoxia de lncRNA-HAL se abate en un 50% aproximadamente con las dos concentraciones evaluadas del inhibidor. Sin embargo, la concentración mayor no causó una disminución aditiva (como se observó en HK2 y ABCB1) en la expresión de lncRNA-HAL (Figura 13). Estos resultados sugieren que lncRNA-HAL en efecto es un gen de respuesta a hipoxia, cuya regulación transcripcional recae parcialmente en la actividad de HIF-1, pero la expresión de lncRNA-HAL en hipoxia parece necesitar de otros factores transcripcionales como podría ser NF-κB o p53, dada la respuesta parcial de este transcrito al 2-o-metoxi-estradiol. En este sentido, resultaría importante evaluar la función de otros factores de transcripción en la expresión de lncRNA-HAL en condiciones hipóxicas.



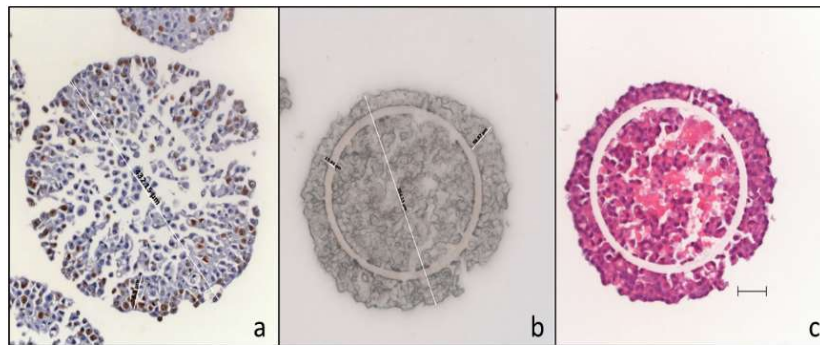
**Figura 13. Efecto de la inhibición de HIF-1 en la expresión de lncRNA-HAL.** Se evaluó el efecto en la expresión de lncRNA-HAL y tres genes blanco de HIF-1 (HK2, ADM y ABCB1) de un inhibidor farmacológico de HIF-1 (2-o-metoxi-estradiol) mediante RT-qPCR. A manera de control se analizó la expresión de cada transcrito en condiciones normóxicas de cultivo (O<sub>2</sub> atmosférico), y la inhibición de HIF-1 se realizó en condiciones de

hipoxia severa (0.1% de O<sub>2</sub>). Se utilizaron dos concentraciones de 2-o-metoxiestradiol, 5 y 10uM. Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 vía, 3 réplicas biológicas. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p0.005.

### Evaluación de la expresión de lncRNA-HAL en las poblaciones de los esferoides.

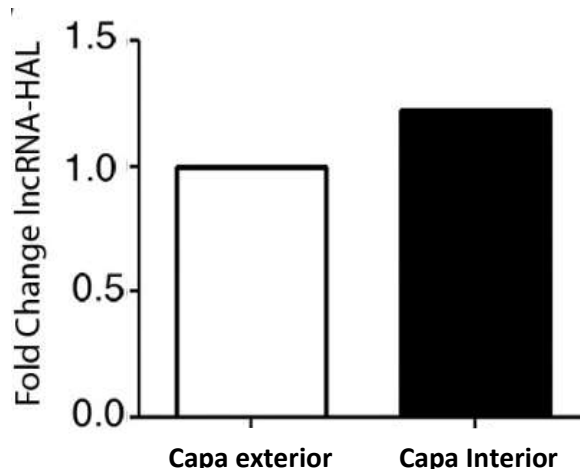
En los MCTS de 20 días las condiciones microambientales como hipoxia y acidosis ocurren en poblaciones celulares específicas, las poblaciones no proliferativas y aponecróticas en las regiones internas de los esferoides. Por este motivo se decidió determinar en qué regiones y poblaciones de los MCTS se expresaban preferencialmente lncRNA-HAL.

Primero se analizó en qué región de los MCTS se expresaban los lncRNAs. Para evaluar esto, los esferoides se dividieron en dos zonas, la externa con una población mayoritariamente proliferante y normóxica, y la capa interna con una población mayoritaria de células quiescentes e hipóxicas (72). Con el fin de separar ambas poblaciones se realizaron cortes de 10um de esferoides de 20 días, estos se montaron en laminillas y se separó la capa externa de la interna usando un microdisector laser. La capa externa se delimitó como la zona que se encontraba en los 50um de la parte exterior del esferoide, y la capa interna fue el resto del esferoide salvo esa región de 50um. Las capas se delimitaron de acuerdo a la expresión de Ki67 y p27 en esferoides de 20 días previamente reportados por nuestro grupo (72). En la figura 14 se muestra cómo se delimitaron y separaron ambas capas utilizando el sistema de micro disección laser.



**Figura 14. Separación de la capa externa e interna de MCTS de 20 días mediante micro disección láser.** En el panel A se muestran los cortes de los esferoides de 20 días teñidos con hematoxilina/eosina. En el Panel B se muestra el corte realizado en los esferoides de 20 días con el sistema de micro disección laser. En el panel C se muestra el corte realizado, y una tinción posterior con Eosina. Barra de escala de 50um.

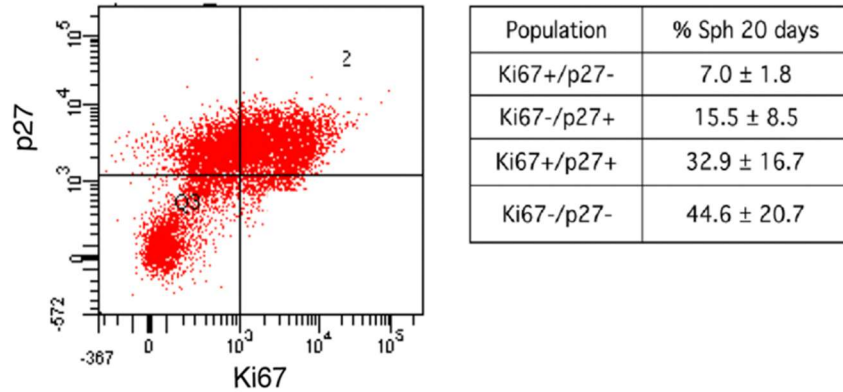
Se realizó el corte de 120 MCTS y posteriormente se recuperaron las capas externas e internas de los esferoides empleando una aguja de jeringa. Se extrajo RNA total de cada una de las capas y se analizó la expresión de lncRNA-HAL y lncMat2B. Se observó que la expresión de lncRNA-HAL es ligeramente mayor en las capas internas de los MCTS que en las externas (Figura 15).



**Figura 15. Expresión de lncRNA-HAL en las capas interna y externas de MCTS de 20 días.** Se analizó la expresión de lncRNA-HAL en las secciones internas y externas de los esferoides de 20 días, se realizó un pool de 120 MCTS. RT-qPCR. Expresión de un pool de 120 esferoides, sin análisis estadístico.

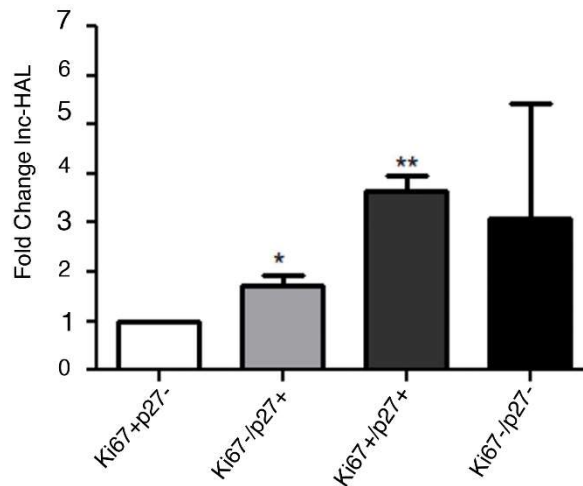
Observar el enriquecimiento sutil de ambos lncRNAs en las capas internas de los esferoides, nos permitió preguntarnos si la expresión de los lncRNAs estaría más restringida a alguna población particular de los esferoides. Primero se decidió evaluar cuáles eran las poblaciones de los esferoides en función de su fenotipo proliferativo. Para esto se tiñeron las células de esferoides de 20 días con anticuerpos contra Ki67, una proteína asociada con células proliferativas (se expresa en la fase G1, S, G2 y M (262)) y contra p27, un inhibidor de CDK's que bloquea la transición G0-G1 y G1-S en diferentes modelos celulares, lo que lo convierte en un excelente marcador de quiescencia (263-266). Por lo que el uso de ambos marcadores podrían diferenciar las poblaciones proliferativas de las quiescentes en los esferoides. Los esferoides teñidos simultáneamente con ambos anticuerpos se analizaron por citometría.

Al realizar el experimento se observó algo muy interesante, el esferoide parece estar compuesto por al menos 4 poblaciones distintas. Las dos poblaciones minoritarias corresponden a la población proliferativa (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup>) que constituye aproximadamente un 7% (+/-1.8) y la población quiescente (ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup>) que constituye un 15.5% (+/- 8.5) de las células de esferoide. Sin embargo, se observaron además dos poblaciones mayoritarias de los esferoides. La población doble positiva Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup> (32.9% +/- 16.7) las cuales debido a la expresión de Ki67 y p27 se sugiere que podrían ser células que comienzan el arresto en la fase G1 del ciclo celular, o bien se encuentran en una transición hacia quiescencia (267). Así mismo, se observó una población que no expresa ninguno de los marcadores (ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup>) que constituye un 44.6% (+/-20.7) de las células del esferoide, la ausencia de expresión de ambos marcadores podría sugerir que se trata de células quiescentes que se preparan para entrar de nuevo en ciclo celular (Figura 16).



**Figura 16. Análisis de las poblaciones de los MCTS en base a su fenotipo proliferativo.** Se determinó mediante citometría de flujo la expresión de Ki67 y p27 en las células de un esferoide de 20 días. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de 4 poblaciones, una proliferativa (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup>), una quiescente (Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup>), una en arresto en G1 (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup>) y una quiescente en transición a ciclo (Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup>). En el panel de la izquierda se muestra un dot blot donde se observa la distribución de las células según su expresión de Ki67 y p27. En la tabla de la derecha se muestran los porcentajes de cada población dentro de los esferoides de 20 días, tomados de 4 réplicas biológicas distintas.

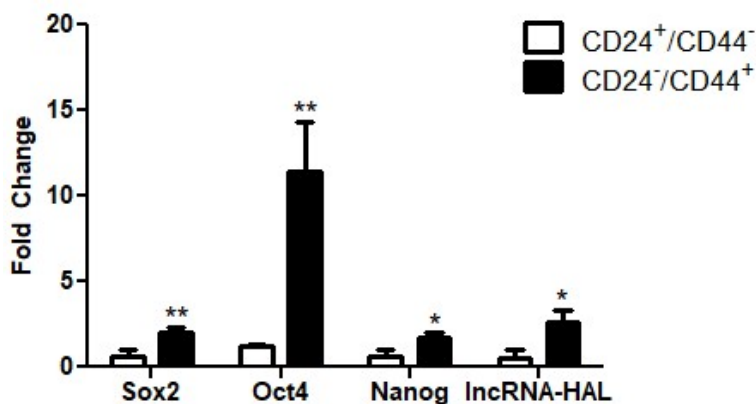
Utilizando los resultados obtenidos mediante citometría de flujo se decidió separar por Cell Sorting cada una de las cuatro poblaciones y analizar la expresión de lncRNA-HAL en las diferentes poblaciones. Los resultados obtenidos mostraron que lncRNA-HAL presentaba una expresión significativamente mayor en la población quiescentes (Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup>) y en la población de arresto en G1 (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup>), con respecto a la expresión en la población proliferativa (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup>) (figura 17). Estos resultados son congruentes con lo observado de la expresión de lncRNA-HAL, la cual es dependiente de la hipoxia, y se expresa más en las zonas internas de los esferoides, por lo que la expresión en las poblaciones no proliferativas corresponde con los resultados previamente obtenidos.



**Figura 17. Expresión de lncRNA-HAL en las diferentes poblaciones de MCTS de 20 días.** Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de lncRNA-HAL en células sorteadas de las cuatro poblaciones de MCTS de 20 días (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup>, Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup>, Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup> y Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup>). ANOVA de dos vías, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

El modelo de los MCTS ha sido utilizado ampliamente como un modelo experimental que permite el enriquecimiento de la población de células troncales tumorales (CSC) (268, 269). Así mismo, algunos grupos han reportado que las poblaciones celulares que se encuentran en el núcleo hipóxico de los esferoides están enriquecidas de CSC (124, 270). Esto nos permitió preguntarnos si lncRNA-HAL podría estar relacionado con la población de CSC de los MCTS de 20 días. Para aislar a la población de CSC dentro de los esferoides se decidió utilizar un marcaje con los antígenos de superficie CD44 y CD24, para después separar las poblaciones troncales mediante aislamiento celular por citometría de flujo ("Cell sorting"). Ha sido ampliamente reportado en cáncer de mama que una población de CSC puede ser identificada por este marcaje y presenta un inmunofenotipo CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (271). Para evaluar la expresión de lncRNA-HAL en la población de CSCs se aisló la población CSC (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>) y se comparó la expresión de lncRNA-HAL con la población no CSC (CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>).

Se validó que las células CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> aisladas fuera realmente una población en células con un fenotipo troncal, decidimos evaluar la expresión de tres marcadores de troncalidad, Oct4, Sox2 y Nanog, en comparación con la población no troncal. Los resultados mostraron que la población CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> presenta un incremento en la expresión de los genes de troncalidad. Además, también se observó que la expresión de lncRNA-HAL presenta un incremento comparable al observado para Sox2 en la población CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (Figura 18). Este resultado, podría implicar que la expresión de lncRNA-HAL podría darse en una población muy particular de células cancerosas, una población de células con fenotipo troncal y proliferativamente quiescentes.



**Figura 18. Expresión de lncRNA-HAL en la población de células troncales de la línea MCF-7.** Determinación mediante RT-qPCR de la expresión de lncRNA-HAL en la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> y CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> de MCTS de 20 días de cultivo. ANOVA de dos vías. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

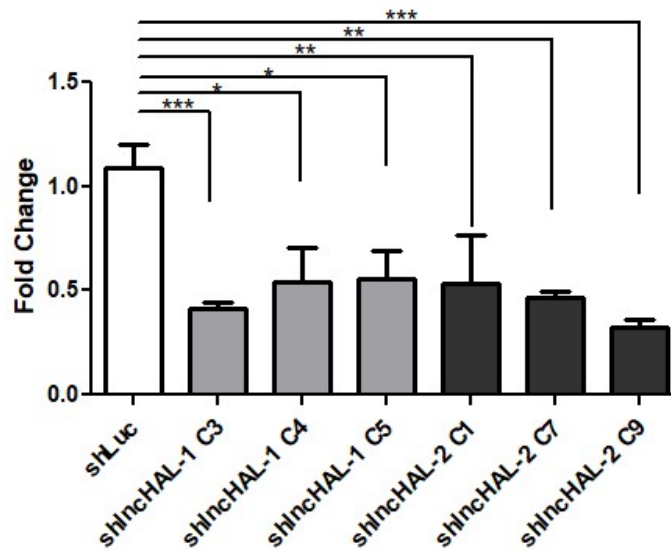
Este conjunto de resultados sugiere que lncRNA-HAL podría regular el fenotipo quiescente de las células CSC de la línea MCF-7 y podría además ser resultado de la condición de hipoxia que se presenta en los esferoides de 20 días.

En las siguientes secciones nos concentraremos en los experimentos realizados para conocer la función biológica de lncRNA-HAL.

#### Manipulación de la expresión de lncRNA-HAL.



El siguiente paso fue analizar la función biológica de lncRNA-HAL en el fenotipo maligno de la línea MCF-7 se decidió hacer un modelo de pérdida de función del lncRNA-HAL. Se empleó un sistema de inhibición postranscripcional mediante el uso de shRNAs. Para esto, se diseñaron 2 shRNAs dirigidos contra ambos extremos del transcrito de lncRNA-HAL, los cuales fueron clonados para su expresión estable en el plásmido pSIREN-RetroQ. Se transfectaron establemente células MCF-7 y se realizó una subclonación de las células estables con el fin de seleccionar aquellas subclonas que tuvieran un nivel mayor de silenciamiento. El silenciamiento con ambos shRNAs condujo a una disminución de un 50% en la expresión de lncRNA-HAL en las 6 subclonas seleccionadas (Figura 19). Como control negativo del silenciamiento se utilizó un shRNA control contra el transcrito de luciferasa.

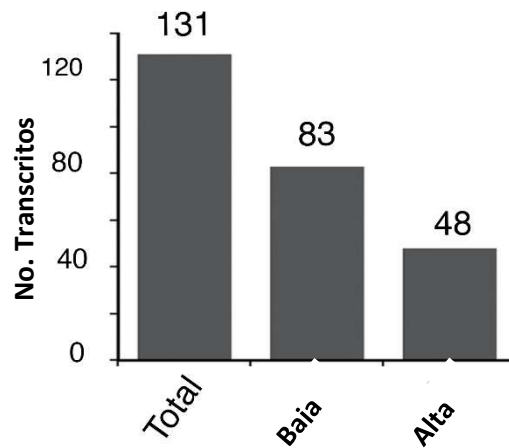


**Figura 19. Silenciamiento de lncRNA-HAL mediante shRNAs.** Análisis mediante RT-qPCR de 6 subclonas generadas de las transfecciones estables de ambos shRNAs. ANOVA de dos vías, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

Las tres subclonas de cada shRNA, que se muestran en la Figura 19, se mezclaron con el fin de obtener una población celular con silenciamiento de lncRNA-HAL. Se consideró, además, que el nivel de silenciamiento de un 50% obtenido era adecuado para evaluar en este sistema la posible función biológica de lncRNA-HAL.

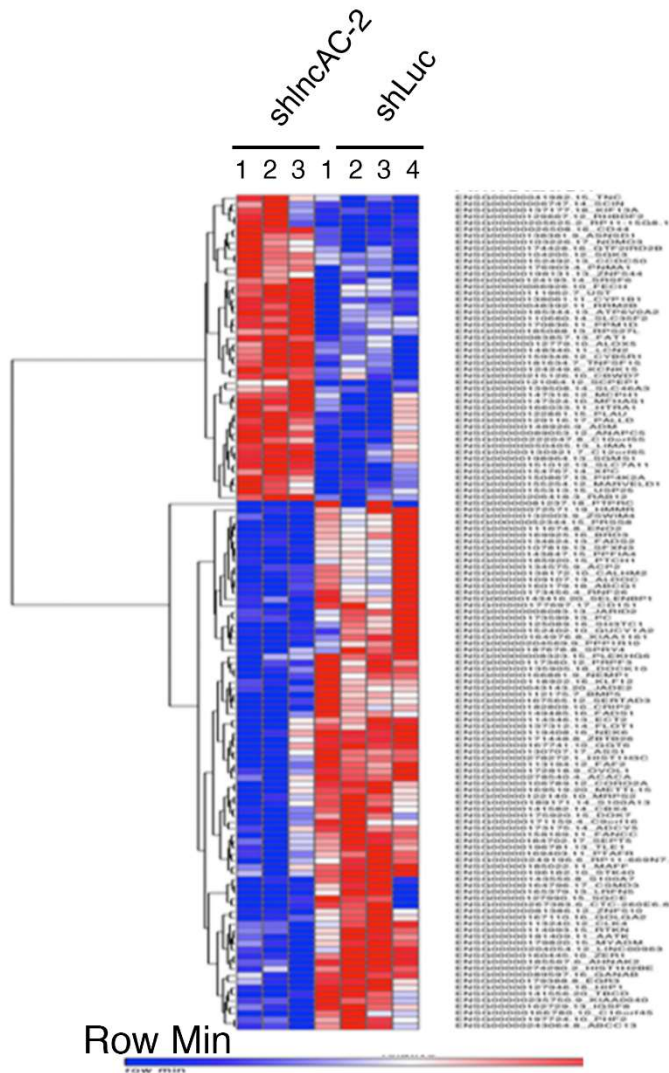
#### Análisis del efecto de lncRNA en el perfil de expresión genética de la línea MCF-7.

Con el fin de evaluar que posibles procesos celulares y blancos moleculares podría regular lncRNA-HAL se decidió evaluar su efecto sobre el perfil transcripcional de las células MCF-7. Para esto, se realizó un análisis mediante RNA-seq del transcriptoma de células silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-2) y se comparó con el transcriptoma de la línea control (shLuc). Los resultados obtenidos mostraron que el knock-down de lncRNA-HAL causó el cambio en la expresión de 131 genes, dentro de los cuales 83 genes disminuyeron su expresión y 48 genes incrementaron su expresión (Figura 20).



**Figura 20. Cambio en el perfil transcripcional por el silenciamiento de lncRNA-HAL en células MCF-7.** Genes que cambiaron su expresión tras el silenciamiento del gen lncRNA-HAL, análisis mediante RNA-seq.

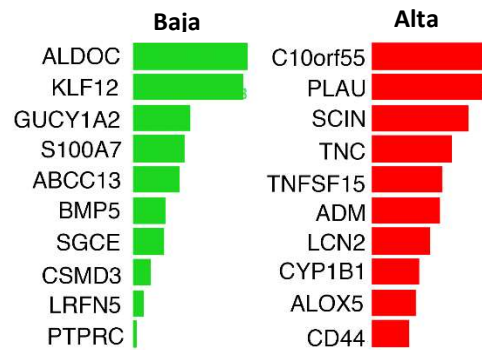
Al observar el cambio en el nivel de expresión de los 131 genes en las 6 muestras secuenciadas mediante un mapa de calor, se observó que las tres muestras silenciadas para lncRNA-HAL se agrupaban adecuadamente en el mapa de calor, diferenciándose de las muestras de shLuc. (Figura 21).



**Figura 21. Cambio en la expresión de 131 genes tras el silenciamiento de lncRNA-HAL.** Agrupamiento jerárquico mediante un mapa de calor de los 131 genes que cambiaron al disminuir la expresión de lncRNA-HAL. El color azul, corresponde a una disminución en la expresión, mientras que el color rojo corresponde a un incremento en la expresión de dicho gen.

Los diez genes codificantes que más incrementaron su expresión fueron: C10orf55, PLAU, SCIN, TNC, TNFSF15, ADM, LCN2, CYP1B1, ALOX5 y CD44; y los 10 genes codificantes que más disminuyeron su expresión fueron: ALDOC, KLF12, GLUCYA2, S100A7, ABCC13, BMP5, SGCE, CMSD3, LRFN5 y PTPRC (Figura 22). Una buena parte de los genes que se sobreexpresaron tienen que ver con la interacción con la matriz extracelular, y participan en funciones celulares como proliferación, migración, supervivencia y troncalidad. En el caso de los genes que disminuyeron su expresión, algunos tienen que ver con metabolismo, migración, invasión y proliferación, otros con matriz extracelular.

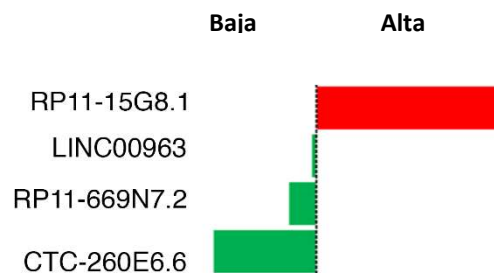
Top 10 mRNA (Fold Change)



**Figura 22. Top 10 de genes codificantes cuya expresión se modificó por el silenciamiento de lncRNA-HAL.** Se muestra el cambio en la expresión predicho por el ensayo de RNA-seq, de los 10 genes codificantes que más incrementaron su expresión y los 10 genes que más disminuyeron su expresión. El color verde corresponde a transcritos cuya expresión disminuyó, el color rojo corresponde a genes cuyos transcritos incrementaron sus niveles.

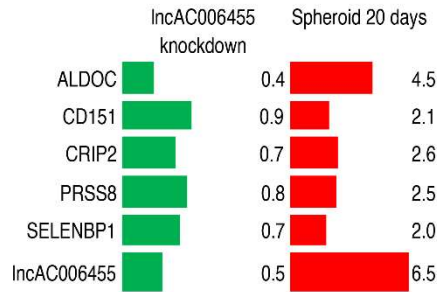
No sólo se observó un cambio en la expresión de genes codificantes, sino que un pequeño grupo de genes no codificantes también modificaron su expresión como resultado de la disminución en la expresión de lncRNA-HAL (Figura 23).

Noncoding RNA (Fold Change)



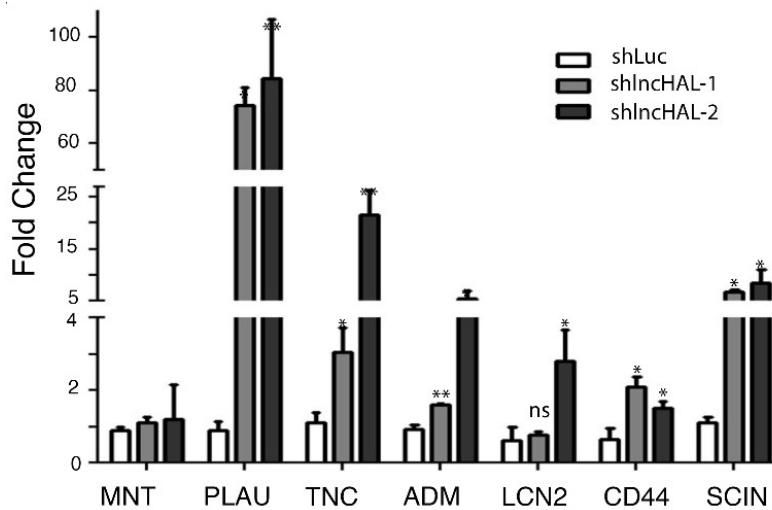
**Figura 23. Cambio en la expresión de genes no codificantes posiblemente modulados por lncRNA-HAL.** Cambio en el perfil de expresión de los 4 RNAs no codificantes que cambiaron su expresión tras el silenciamiento de lncRNA-HAL. El color verde corresponde a transcritos cuya expresión disminuyó, el color rojo corresponde a genes cuyos transcritos incrementaron sus niveles.

Un fenómeno interesante, fue el hecho de que 6 de los genes que modificaron su expresión en el knock-down de lncRNA-HAL también presentaron un cambio en el transcriptoma de los esferoides de 20 días, pero con una expresión inversa. Esto sugiere que en los esferoides lncRNA-HAL podría participar en el perfil de expresión génica (Figura 24).



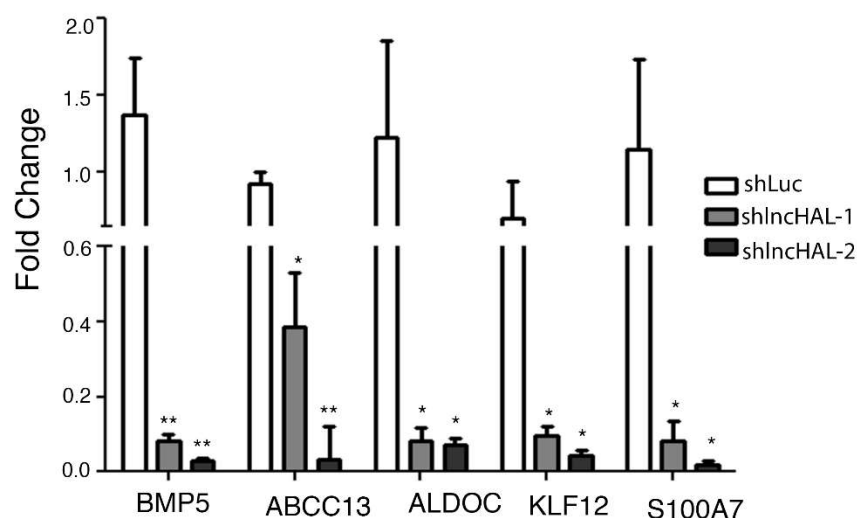
**Figura 24. Cambio en los niveles de expresión de genes que se comparten con el cambio en el transcriptoma de MCTS de 20 días.** Cambio en la expresión de 6 genes que se compartieron entre los experimentos de esferoides de 20 días y el silenciamiento de lncRNA-HAL. El color verde corresponde a transcritos cuya expresión disminuyó, el color rojo corresponde a genes cuyos transcritos incrementaron sus niveles.

Para validar los resultados obtenidos mediante RNA-seq se seleccionaron aleatoriamente 6 genes codificantes cuya expresión incremento tras el silenciamiento de lncRNA-HAL, 5 genes codificantes cuya expresión disminuyó y 3 genes no codificantes, y se analizó mediante RT-qPCR, el cambio en la expresión tras el silenciamiento de lncRNA-HAL. Como control negativo del cambio se utilizó al gen MNT, se observó que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL no afecta la expresión del gen MNT y sugiere que la expresión de MNT y su función es independiente de lncRNA-HAL. Con respecto a la validación del cambio en la expresión de los genes que incrementaron se logró validar mediante RT-qPCR, el cambio en la expresión de todos, salvo la del gen TNC con el shlncHAL-1 (figura 25).



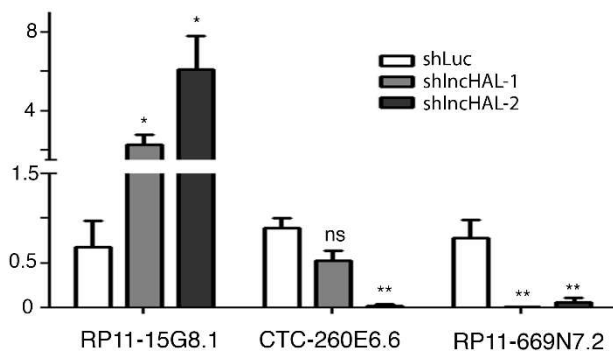
**Figura 25. Análisis de la expresión de 6 genes sobreexpresados debido al silenciamiento de lncRNA-HAL.** Validación mediante RT-qPCR, de la expresión de 5 genes codificantes cuya expresión incrementó debido al silenciamiento de lncRNA-HAL. T de student, \* $p < 0.05$ .

En el caso de los 5 genes que disminuyeron su expresión tras el silenciamiento de lncRNA-HAL, también se logró validar la disminución en la expresión de todos ellos (Figura 26). Estos resultados son importantes porque permiten tener seguridad en las predicciones e hipótesis que se realicen utilizando los datos obtenidos mediante RNA-seq.



**Figura 26. Análisis de la expresión de 6 genes subexpresados debido al silenciamiento de lncRNA-HAL.** Validación mediante RT-qPCR, de la expresión de 5 genes codificantes cuya expresión disminuyó debido al silenciamiento de lncRNA-HAL. T de student, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Finalmente se validó el cambio en la expresión de tres genes no codificantes. En este grupo de genes también se logró validar el cambio en su nivel de expresión, excepto para CTC-260E6.6 en el que no se observó la disminución esperada en el shIncHAL-1 (Figura27).



**Figura 27. Análisis de la expresión de 6 genes subexpresados debido al silenciamiento de lncRNA-HAL.** Validación mediante RT-qPCR, de la expresión de 5 genes codificantes cuya expresión disminuyó debido al silenciamiento de lncRNA-HAL. T de student, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Una vez validados los datos de RNA-seq, decidimos realizar una predicción de aquellos procesos celulares que se podrían afectar por el cambio en el perfil de expresión. Para esto se realizó un análisis mediante el algoritmo IPA. Los resultados arrojados por el análisis de IPA mostró que el cambio en el perfil transcripcional podría causar cambios en la proliferación y ciclo celular de las células, lo que correspondería con los resultados de la expresión de lncRNA-HAL en las poblaciones

del esferoide. Así mismo, también se predijo un posible cambio en la capacidad de supervivencia de las células. Por último, se observó que el silenciamiento de lncRNA-HAL podría afectar la migración e invasión de las células (Tabla 2). Con el fin de conocer más acerca de la función biológica que desempeña lncRNA-HAL, decidimos evaluar si realmente lncRNA-HAL puede afectar estos procesos.

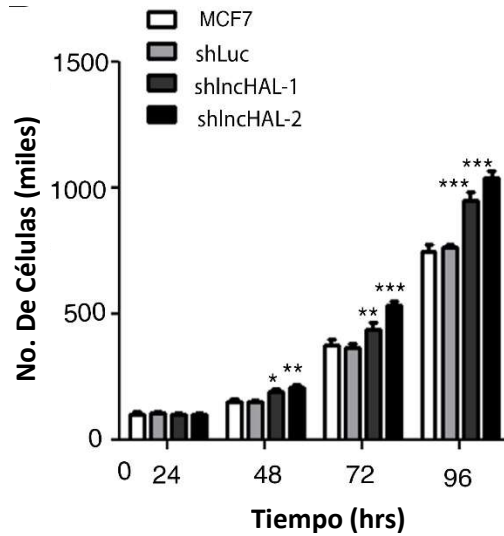
**Tabla 2. Procesos celulares regulados por lncRNAHAL.**

Molecular and Cellular Functions	
Name	No. of molecules
Cellular Growth and proliferation	57
Cell Cycle	19
Cellular movement	35
Cell death and survival	46
Cellular assembly and organization	29

#### **Función de lncRNA-HAL en la proliferación de las células MCF-7.**

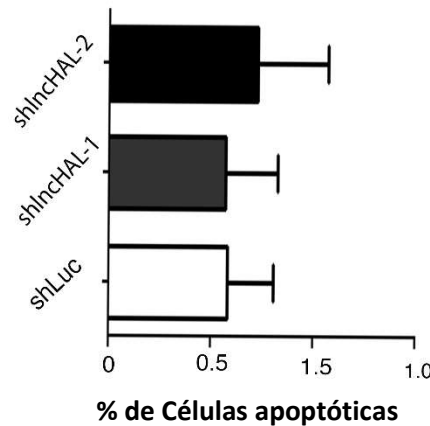
Como se mencionó anteriormente, el análisis mediante el algoritmo de IPA mostró que el proceso en el que intervenían un mayor número de transcritos fue el de crecimiento celular y proliferación en conjunto con ciclo celular. Por este motivo se decidió evaluar primero el efecto que tiene lncRNA-HAL sobre la proliferación de la línea celular MCF-7.

Con el fin de evaluar el efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre la proliferación de la línea MCF-7, se decidió realizar una curva de crecimiento de las líneas silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2), y de la línea control (shLuc). Los resultados obtenidos mostraron que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL condujeron a un incremento en el número de células respecto al tiempo, en comparación con el control shLuc (Figura 28). Este incremento en el número de células, podría ser el resultado de un aumento en la proliferación de las células MCF-7 o bien debido a una disminución en la tasa de muerte celular basal.



**Figura 28. Efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL en la proliferación de las células MCF-7.** Curva de crecimiento de células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shIncHAL-1 y shIncHAL-2) y de las células control shLuc. ANOVA de dos vías, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

Con el fin de evaluar si el incremento en el número de células podría ser debido a un decremento en la tasa de muerte celular basal de la línea MCF-7, decidimos determinar el efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre la apoptosis basal de las células MCF-7. Para evaluar esto, se realizó un ensayo de TUNEL con el fin de determinar el porcentaje de células en un proceso de apoptosis irreversible tras el silenciamiento de lncRNA-HAL. Los resultados obtenidos mostraron que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL no afectó el porcentaje de células apoptóticas (Figura 29).

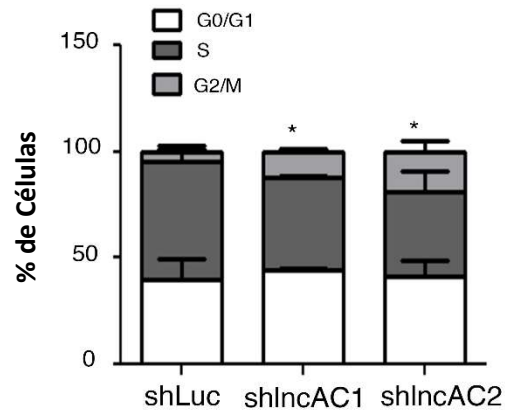


**Figura 29. Impacto de la disminución en la expresión de lncRNA-HAL sobre la muerte celular en la línea MCF-7.** Ensayo de TUNEL para determinar el porcentaje de células apoptóticas en células shIncHAL-1, shIncHAL-2 y shLuc. T de student.

Dado que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL no condujo a un cambio en el porcentaje de células apoptóticas, o al menos en un proceso apoptótico tardío, decidimos evaluar si el efecto observado en la curva de crecimiento podría ser resultado de un incremento en la proliferación

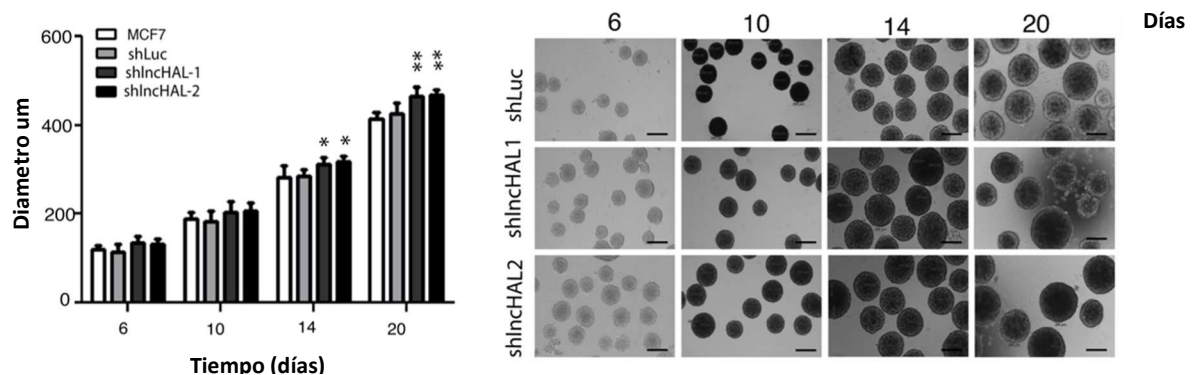


celular. Para evaluar esto decidimos hacer un ensayo de perfil de ciclo celular mediante un marcaje con Ioduro de propidio. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de lncRNA-HAL condujo a un incremento en la población de células en fase G2/M del ciclo celular (Figura 30). Este resultado en conjunto con el resultado de la curva de crecimiento sugiere que efectivamente el silenciamiento de lncRNA-HAL condujo a un incremento en la proliferación de la línea MCF-7 y como resultado un incremento en la cantidad de células que llegan hasta la fase G2/M del ciclo celular.



**Figura 30. Efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL en el ciclo celular de la línea MCF-7.** Perfil de ciclo celular mediante tinción con Ioduro de propidio en células shlncHAL-1, shlncHAL-2 y shLuc. T de student, \*p<0.05.

Con el fin de determinar qué efecto tendría el silenciamiento de lncRNA-HAL sobre el crecimiento de los esferoides se decidió realizar una curva de crecimiento de los esferoides de las líneas silenciadas para lncRNA-HAL y la línea control, y tomar el incremento en el diámetro de los esferoides como una medida indirecta de la proliferación de las células dentro del modelo tridimensional. Se observó que al silenciar la expresión de lncRNA-HAL en los MCTS conducía a un incremento sutil en el diámetro de los esferoides, sin embargo, este cambio sólo se percibió posterior al día 14 de cultivo (Figura 31). Este fenómeno resultó muy interesante, porque el efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL se observó en las fases de crecimiento de los esferoides cuando se generaría un gradiente de hipoxia. Lo cual sugiere que en los esferoides lncRNA-HAL podría influir en la aparición de un fenotipo quiescente en respuesta al estrés hipóxico que se observa en los esferoides.

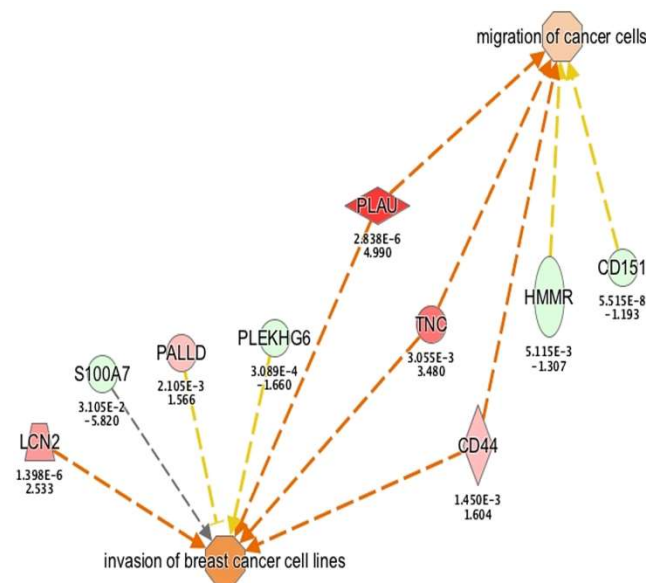


**Figura 31. Efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL en el crecimiento de los MCTS.** Curva de crecimiento de esferoides de la línea MCF-7 silenciada para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y la línea control (shLuc). El panel de la izquierda muestra la cuantificación del diámetro de los esferoides a los días 6, 10, 14 y 20. En el panel de la derecha se muestran imágenes representativas de los MCTS de 6, 10, 14 y 20 días, barra de escala 200um. ANOVA de dos vías, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Los resultados obtenidos hasta el momento, el hecho de que se expresa en respuesta a hipoxia y se expresa principalmente en las poblaciones quiescentes de los esferoides, además del efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre la proliferación, sugieren que este transcrito podría estar implicado en la adquisición de un fenotipo no proliferativo o quiescente.

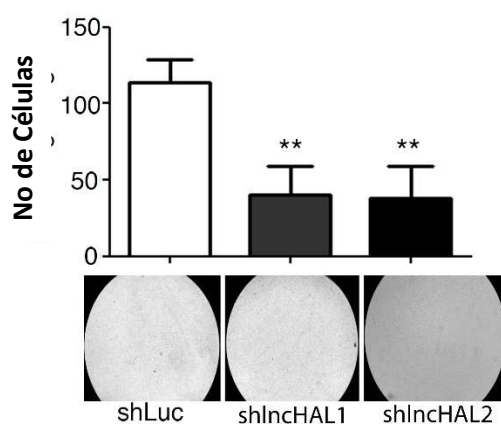
### Efecto de lncRNA-HAL en la migración y degradación de matriz extracelular

El análisis de redes con IPA mostró que 35 genes cuya expresión cambió en función del silenciamiento de lncRNA-HAL influían en los procesos de migración e invasión de las células cancerosas. El modelado por IPA señaló un fenotipo particular en el que aparentemente el cambio en el perfil de expresión podría causar un posible incremento tanto en la capacidad migratoria y de invasión de las células MCF-7. Sin embargo, dado que algunos genes que incrementan la migración e invasión se vieron disminuidos (S100A7, PLEKHG6, HMMR, CD151) resulta difícil predecir con confianza un incremento en el fenotipo migratorio de las células MCF-7 (Figura 32). Se observa, que dentro de los genes que inducen fuertemente un fenotipo migratorio e invasivo, se encuentran PLAU, TNC, CD44, PALLD y LCN2. Dos de ellos asociados con un fenotipo progenitor y por encontrarse en los frentes de migración de los tumores, TNC y CD44. En el caso de PLAU este se encuentra más asociado a la capacidad de degradar la ECM, el fuerte incremento en esta molécula podría sugerir un fenotipo invasivo.



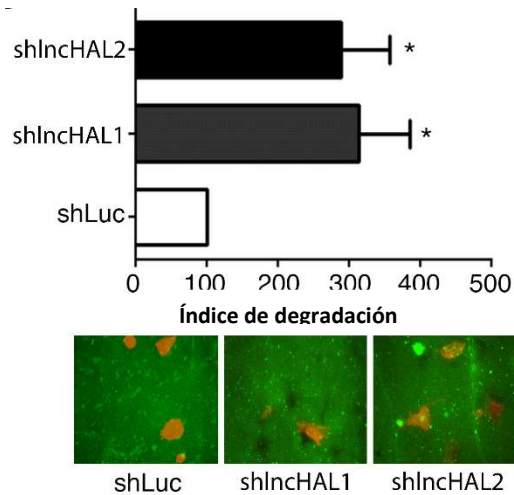
**Figura 32. Predicción del impacto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre la migración e invasión.** Red predicha por IPA a partir de los datos de RNA-seq obtenidos. Muestra los genes cuya expresión fue afectada por lncRNA-HAL y que participan en los procesos de migración e invasión.

Con el fin de determinar si lncRNA-HAL podría regular la migración de las células MCF-7 decidimos realizar un ensayo de migración In vitro en cámara de Boyden. Para realizar este ensayo primero se arrestaron las células MCF-7 retirando el suero fetal bovino y el rojo de fenol del medio durante 24 horas. Posteriormente se colocaron las células en la cámara de Boyden y se colocó Suero fetal bovino al 15% como quimioatrayente en el compartimento inferior con el fin de inducir la migración en las células MCF-7. Se observó que el silenciamiento de lncRNA-HAL causó una disminución en el número de células que lograron migrar del compartimento superior al inferior en un lapso de 24hrs (Figura 33).



**Figura 33. Efecto de lncRNA-HAL sobre la migración de células MCF-7.** Ensayo de migración In vitro en cámaras de Boyden (insertos transwell) de células silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y células control (shLuc). T de student, \*\*p<0.01.

Estos resultados indican que el efecto de lncRNA-HAL sobre la migración de las células MCF-7 presentó una correlación positiva, a diferencia de lo predicho por el algoritmo IPA. Entonces, decidimos determinar el efecto de lncRNA-HAL sobre la capacidad de degradar matriz extracelular, como una medida indirecta de la invasión en células MCF-7. Para esto se realizó un ensayo de degradación de matriz extracelular In vitro, en el que se colocaron las células encima de una matriz de gelatina marcada con fluoresceína. La actividad proteolítica de las células se midió en base al área de degradación (zonas donde se perdió la fluorescencia de la gelatina) presente alrededor de las células sembradas. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de lncRNA-HAL condujo a un incremento en la actividad proteolítica de las células MCF-7. Este fenómeno fue interesante debido a que el gen que más se sobreexpresa tras el silenciamiento de lncRNA-HAL fue el activador de plasminógeno semejante a Urokinasa (PLAU, Upa), el cual codifica para una proteasa que activa a distintas proteinasas de matriz extracelular (Figura 34).

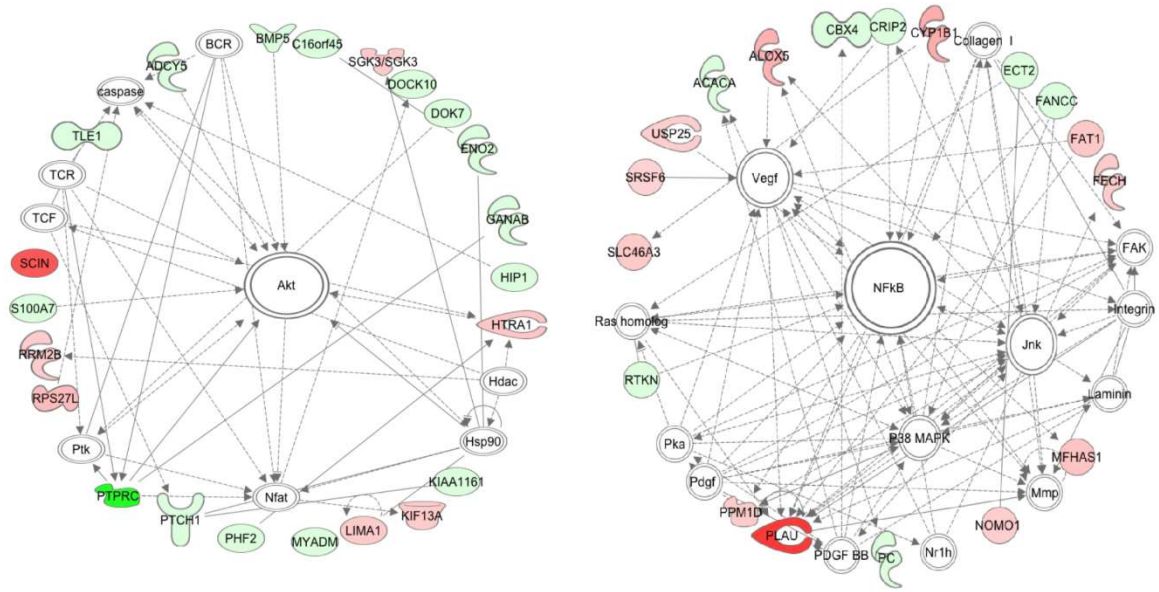


**Figura 34. Efecto del silenciamiento de lncRNA-HAL sobre la capacidad de degradación de matriz extracelular.** Ensayo de degradación de gelatina fluorescente de células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shIncHAL-1 y shIncHAL-2) y células MCF-7 control (shLuc). T de student, \* $p < 0.05$ .

Ambos resultados experimentales sugieren que lncRNA-HAL podría funcionar en el shift que opera entre una invasión independiente de proteasas y una invasión dependiente de proteasas. Esto debido a que un incremento en la expresión de lncRNA-HAL podría conducir a un aumento en la motilidad celular y una disminución en la capacidad de remodelar una matriz extracelular. Es decir, en células cancerosas se han reportado distintos tipos de migración a través de una matriz extracelular, dentro de estos destacan la migración ameboide (independiente de proteasas) y la migración mesenquimal (dependiente de proteasas) (272). La inhibición de la migración ameboide puede limitar significativamente la capacidad metastásica en las células de cáncer de mama (273). Un fenómeno interesante es que existe una transición entre una migración ameboide a una migración mesenquimal, de manera que las células pueden modificar o alternar el programa migratorio en función de las señales microambientales que reciben. Se ha demostrado que puede existir una transición de una migración ameboide a una mesenquimal, cuando la tensegridad y el entrecruzamiento de las fibras de colágeno supera un umbral específico (274, 275). Además, se ha observado que la hipoxia puede inducir una transición de una migración colectiva a una migración ameboide y sugiere que HIF-1 puede no sólo inducir una migración mesenquimal, sino también una diseminación independiente de EMT (transición epitelio mesénquima) (276).

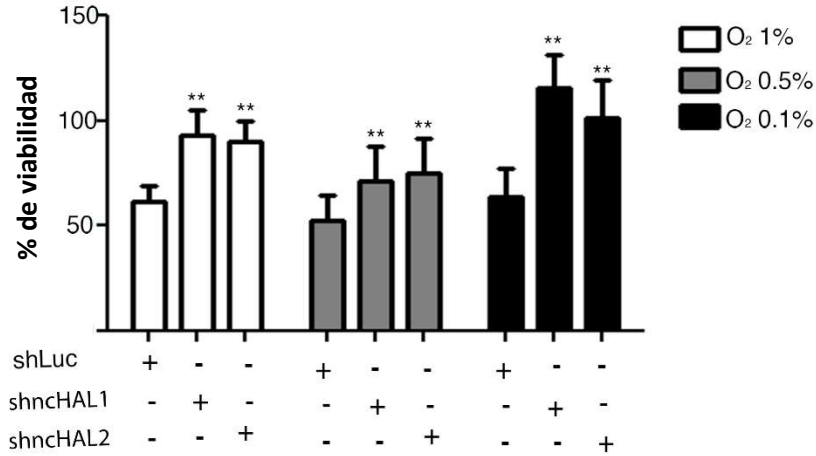
#### **Efecto de lncRNA-HAL sobre la capacidad de supervivencia**

Otro de los procesos celulares que fue predicho por el algoritmo IPA como afectado significativamente por el silenciamiento de lncRNA-HAL fue la supervivencia celular. El análisis de redes modelado por IPA sugirió que en parte el efecto de lncRNA-HAL en la supervivencia podría estar mediado por las vías de Akt y NF- $\kappa$ B (Figura 35). Estas dos vías se han relacionado ampliamente con la capacidad de las células de sobrevivir a diversas condiciones de estrés.



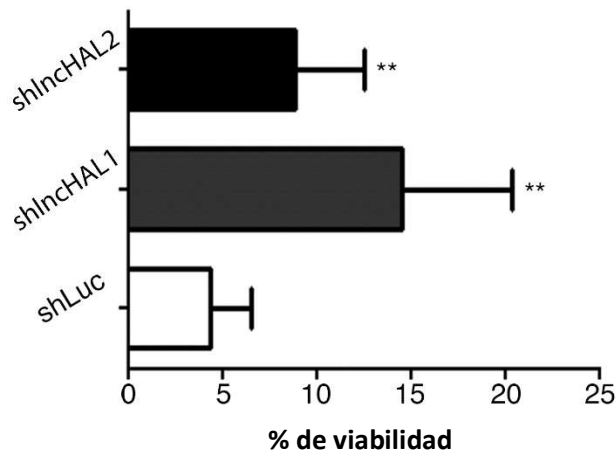
**Figura 35. Redes modeladas por el algoritmo IPA que podrían participar en la supervivencia celular.** Modelado de redes por el algoritmo IPA donde se muestra que las vías de Akt y NF-kB podrían verse afectadas por el silenciamiento de lncRNA-HAL.

Con el fin de evaluar si lncRNA-HAL podría tener una función en la capacidad de las células MCF-7 de sobrevivir a condiciones de estrés específicas. Se realizó un análisis de la vitalidad de las células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL y las células control bajo dos condiciones de estrés: hipoxia y privación de factores de crecimiento (SFB). Para evaluar la supervivencia de las células en condiciones de hipoxia, nuevamente se utilizaron las tres condiciones de hipoxia previamente usadas, una hipoxia leve (1%), moderada (0.5%) y severa (0.1%). Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de lncRNA-HAL condujo a una mayor capacidad de las células de sobrevivir en las tres condiciones de hipoxia analizadas (Figura 36). Este fenómeno es interesante porque apoya la propuesta de que lncRNA-HAL podría ser un transcrito que se expresa en condiciones de hipoxia y que regula la adquisición de un fenotipo no proliferativo, incluso podría tratarse de un sensibilizador a muerte celular cuando un fenómeno de estrés celular se presenta en las células.



**Figura 36. Efecto de lncRNA-HAL en la supervivencia celular en condiciones de hipoxia.** Análisis de vitalidad celular mediante un ensayo de MTS de células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y células control (shLuc) en tres condiciones de hipoxia: leve (1%), moderada (0.5%) y severa (0.1%). ANOVA de dos vías. \*\*p<0.01.

Así mismo, se evaluó si lncRNA-HAL tendría una función sobre la capacidad de sobrevivir a la privación de factores de crecimiento (SFB). Para evaluar esto, se retiró del medio de cultivo el suero fetal bovino (SFB) y se mantuvo la privación durante un periodo de 5 días. Se observó que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL conducía a un incremento en la capacidad de sobrevivir a la privación de suero de las células MCF-7, en comparación con el control shLuc (Figura 37). Este resultado es congruente con lo observado en hipoxia, lo que sugiere que el silenciamiento de lncRNA-HAL podría impedir o bien el arresto en ciclo de las células MCF-7 ante ambos tipos de estrés o el proceso de muerte celular derivado del estrés ambiental al que se sometieron las células MCF-7.

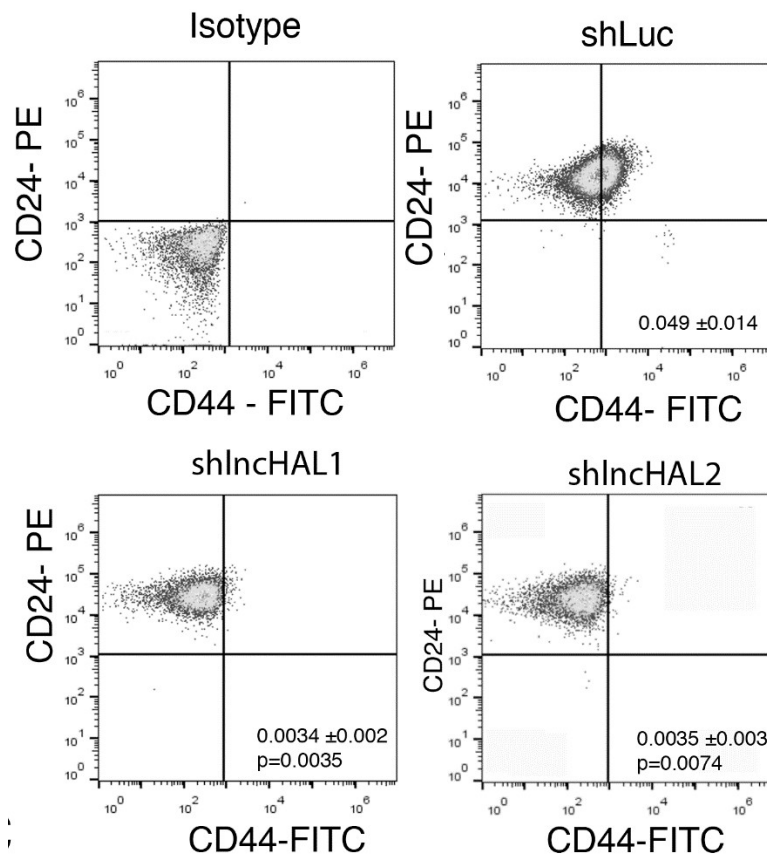


**Figura 37. Efecto de lncRNA-HAL en la supervivencia a la privación de factores de crecimiento (SFB).** Ensayo de vitalidad mediante MTS de células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y células control (shLuc) en condición de privación de SFB durante 5 días. T de student, \*\*p<0.01.

## Efecto de lncRNA-HAL sobre la población de células troncales tumorales de la línea MCF-7.

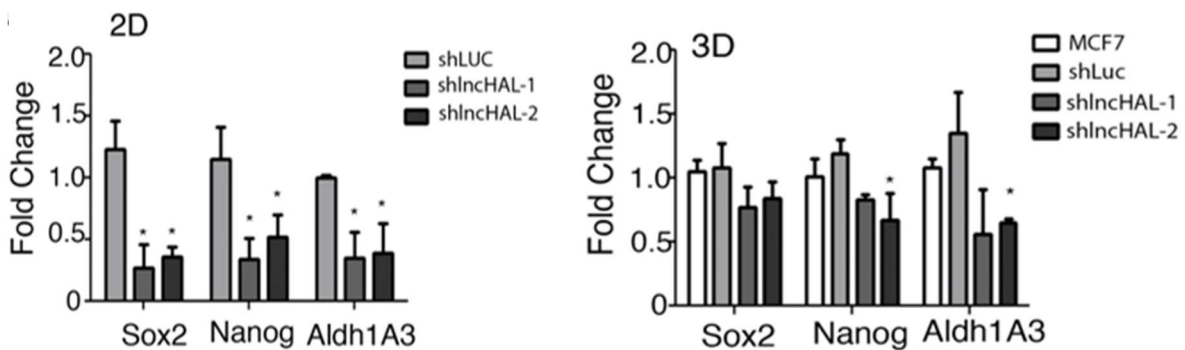
Distintos trabajos previos han demostrado que el cultivo de células cancerosas en forma de MCTS puede incrementar la proporción de la población de células troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés) (124, 268). Así mismo se ha observado que la población de CSC con un fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> son principalmente células con un fenotipo quiescente y mesenquimal (277). Este conjunto de datos nos hizo preguntarnos si lncRNA-HAL podría participar en el fenotipo de las células troncales tumorales CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.

Para evaluar si lncRNA-HAL podría participar en la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, decidimos determinar la proporción de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> en las células silenciadas para lncRNA-HAL. Para este fin, se tiñeron células MCF-7 con anticuerpos fluorescentes contra CD44 y CD24 y se analizó la proporción de CSC mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de lncRNA-HAL condujo a una disminución en la proporción de CSC (Figura 37). Algo interesante que se observó fue el hecho de que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL causó una disminución en la expresión de CD44 y un incremento en la expresión de CD24 (Figura 38).



**Figura 38. Impacto de lncRNA-HAL en la proporción de células troncales tumorales CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.** Análisis mediante citometría de flujo del inmunofenotipo CD44/CD24 en células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y células control (shLuc). ANOVA de dos vías, la p se muestra en los recuadros de shlncHAL-1 y shlncHAL-2.

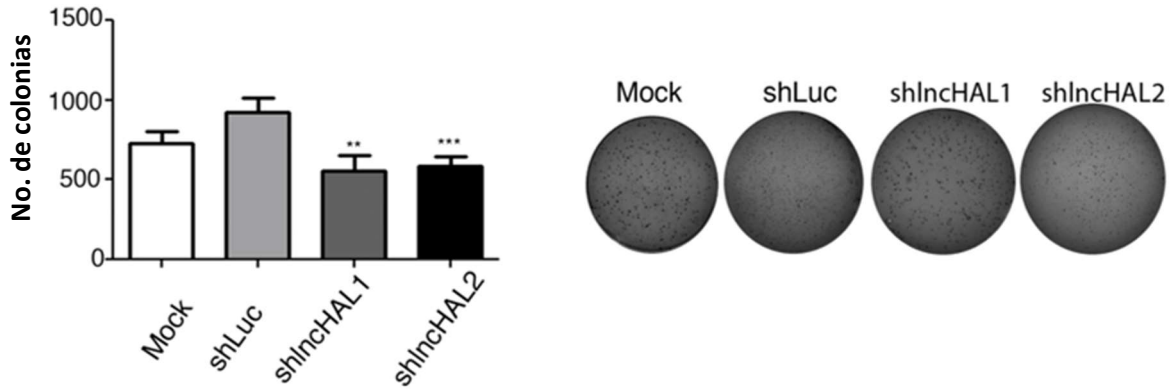
Con el fin de corroborar el efecto de lncRNA-HAL en la proporción de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> decidimos determinar si su expresión podría impactar en la expresión de genes responsables de mantener el fenotipo troncal. Para esto, se evaluó la expresión de 3 genes relacionados con el fenotipo troncal (Sox2, Nanog y Aldh1A3) en las células silenciadas para lncRNA-HAL. Se observó que la disminución de la expresión de lncRNA condujo a una disminución en la expresión de Sox2, Nanog y Aldh1A3 en células crecidas en monocapa (Figura 39). Además, en un cultivo de esferoides de 20 días se logró replicar esta disminución, pero únicamente en los genes Nanog y Aldh1A3 (Figura 41). Estos resultados sugieren que lncRNA-HAL impacta en el fenotipo de las células troncales directamente. Sin embargo, la ausencia de cambio en el gen Sox2 en los MCTS, podría ser explicado por el modelo complejo que constituyen los esferoides y el inhibir a un único producto génico podría no tener un efecto drástico.



**Figura 39. Impacto de lncRNA-HAL en la expresión de genes marcadores de CSC.** Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de 3 genes marcadores de troncalidad (Sox2, Nanog y Aldh1A3) en células silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y células control (shLuc). En el panel de la izquierda se muestra la expresión en células crecidas en monocapa, mientras que en el panel de la derecha se muestra la expresión en MCTS de 20 días.

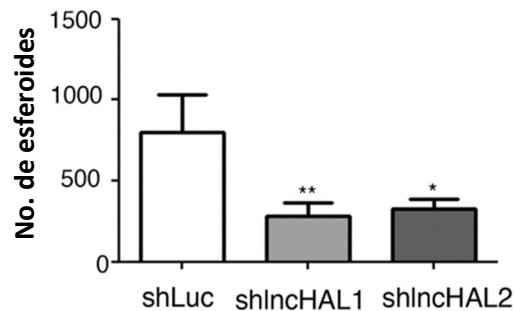
Con el fin de evaluar funcionalmente, si efectivamente lncRNA-HAL podría afectar el fenotipo de las células troncales tumorales a nivel de función, decidimos determinar el impacto de lncRNA-HAL en el crecimiento clonogénico. Para este fin, decidimos realizar un ensayo de formación de colonias en agar suave, en el cual se evalúa la proporción de células capaces de formar colonias a partir de una sola célula (crecimiento clonogénico) en un contexto libre de anclaje. Se observó que el silenciamiento de lncRNA-HAL causó una disminución en la cantidad de colonias obtenidas, en comparación con la línea control que expresa un shRNA contra luciferasa (Figura 40). Este resultado sugiere que lncRNA-HAL si afecta una característica funcional de las CSC, que es el crecimiento clonogénico.





**Figura 40. Efecto de lncRNA-HAL en el crecimiento clonogénico de la línea MCF-7.** Ensayo de clonogenicidad en agar suave para evaluar la capacidad de crecimiento clonogénico de la línea MCF-7 silenciada para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y la línea control (shLuc). ANOVA en dos vías, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

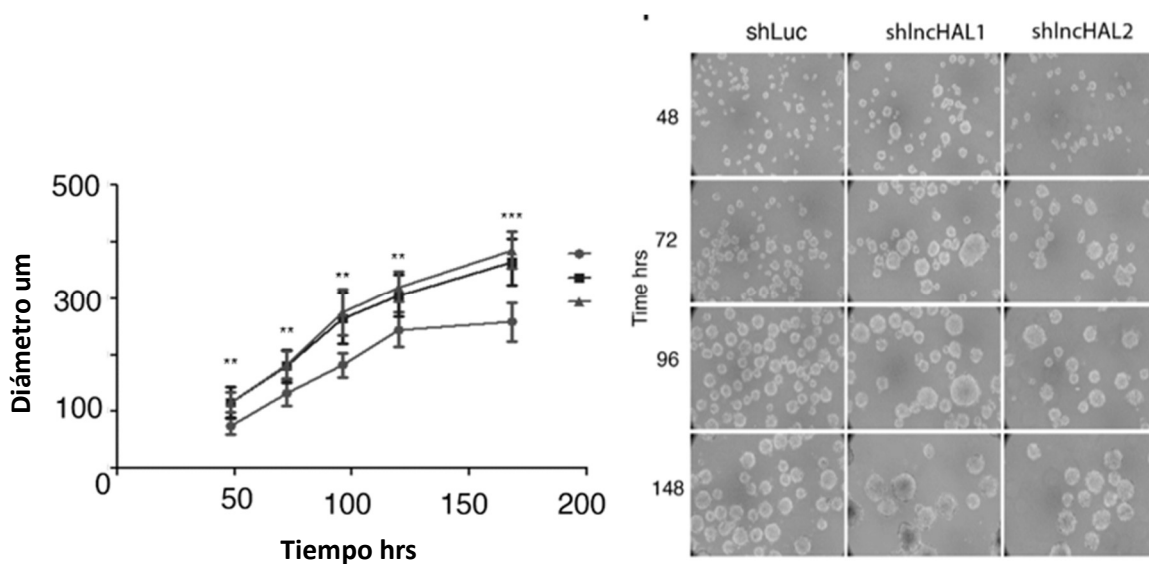
Para corroborar el resultado obtenido en el experimento anterior. Se realizó un ensayo de formación de esferoides clonogénicos, en el cual cada esferoide generado proviene de una única célula y permite cuantificar el número de células con capacidad de generar una colonia entera en un contexto libre de anclaje. Los resultados obtenidos mostraron que la disminución en la expresión de lncRNA-HAL conducía a una disminución importante en el número de esferoides, en comparación con la línea control shLuc. (Figura 41). Estos dos resultados confirman que efectivamente lncRNA-HAL puede participar en el fenotipo troncal y además en una de sus características funcionales que es la clonogenicidad.



**Figura 41. Efecto de lncRNA-HAL en la formación de esferoides clonogénicos.** Ensayo de clonogenicidad, mediante la formación de esferoides clonogénicos en células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2) y la línea shLuc. ANOVA de dos vías, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Finalmente, en el ensayo de formación de esferoides clonogénicos se observó que la disminución de la expresión de lncRNA-HAL no sólo conducía a un descenso en el número de esferoides clonogénicos, sino que también incrementa el tamaño de estos. El experimento mostró que al silenciar a lncRNA-HAL se observaba un incremento en el diámetro de los esferoides, lo cual es congruente con los resultados previamente obtenidos en los ensayos de proliferación (Figura 42). Es decir, que el incremento en el diámetro de los esferoides correspondería con un incremento en

la población proliferativa de la línea MCF-7 y con una disminución en la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> quiescente.



**Figura 42 Efecto de lncRNA-HAL en el crecimiento de esferoides clonogénicos de la línea MCF-7.** Curva de crecimiento de esferoides clonogénicos en medio MammoCult de la línea MCF-7 con una expresión abatida de lncRNA-HAL (shlncHAL-1 y shlncHAL-2), en comparación con la línea control (shLuc). En el panel de la izquierda se muestra la curva de crecimiento de los esferoides clonogénicos, mientras que en el panel de la derecha se muestran imágenes representativas de dichos esferoides. ANOVA de dos vías, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

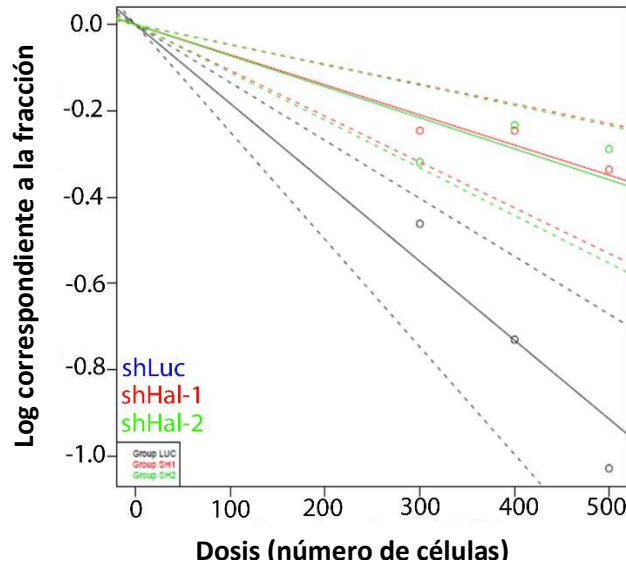
Estos resultados en conjunto indican que lncRNA-HAL podría regular o participar en el proceso molecular a través del cual la respuesta molecular a la hipoxia podría favorecer la aparición, o acentuar un fenotipo de una célula troncal no proliferativa o quiescente.

### Efecto de lncRNA sobre la tumorigenicidad In vivo

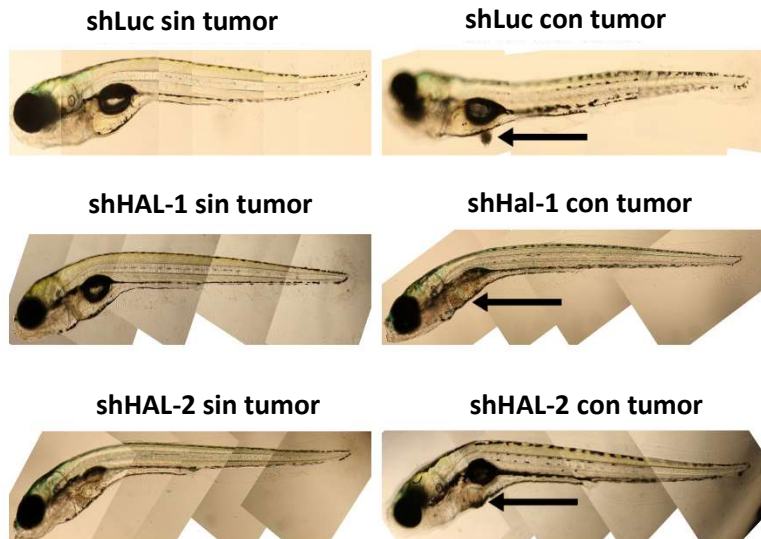
Para evaluar si el efecto observado de lncRNA-HAL sobre la tumorigenicidad de la población CSC observado *In vitro* podría reproducirse *In vivo*, decidimos realizar un ensayo de tumorigenicidad con diluciones limitantes. Este ensayo podría evidenciar *In vivo* cambios en la proporción de células iniciadoras de tumor o CSC. Con el fin de realizar estos ensayos, recurrimos a un modelo de pez zebra (*Danio rerio*), el cual tiene la ventaja de que requiere la inyección de muy pocas células y que los embriones de pez se encuentran inmunosuprimidos hasta aproximadamente el día 11 de vida.

Utilizando este modelo se inyectaron cantidades crecientes de las células shLuc, shlncHAL-1 y shlncHAL-2 en el vitelo de embriones de pez zebra de 2 días de eclosionados. Diariamente se evaluó el crecimiento de los tumores y el número de animales que desarrollaron tumor. El porcentaje de peces con tumor fue evaluado con un análisis de ELDA con el fin de determinar la proporción de la población troncal en las líneas celulares. Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de CSC en la línea celular shLuc fue de 1 CSC por cada  $547 \pm 145$  células tumorales, en la línea celular

shIncHAL-1 fue de 1 CSC por cada  $1433 \pm 495$  ( $p=0.00018$ ) células tumorales y en la línea celular shIncHAL-2 fue de 1 CSC por cada  $1391 \pm 487$  ( $p=00034$ ) células tumorales. Observándose así una disminución significativa en la proporción de células tumorales, derivado de la disminución en la expresión de lncRNA-HAL (Figura 43). Sin embargo, no se observaron cambios en el tamaño o forma de los tumores (Figura 44).



**Figura 43.** Efecto de lncRNA-HAL sobre la tumorigenicidad *In vivo* de la línea MCF-7. Análisis de ELDA (extreme limiting dilution assay) del porcentaje de peces positivos a tumor. Chi cuadrada.

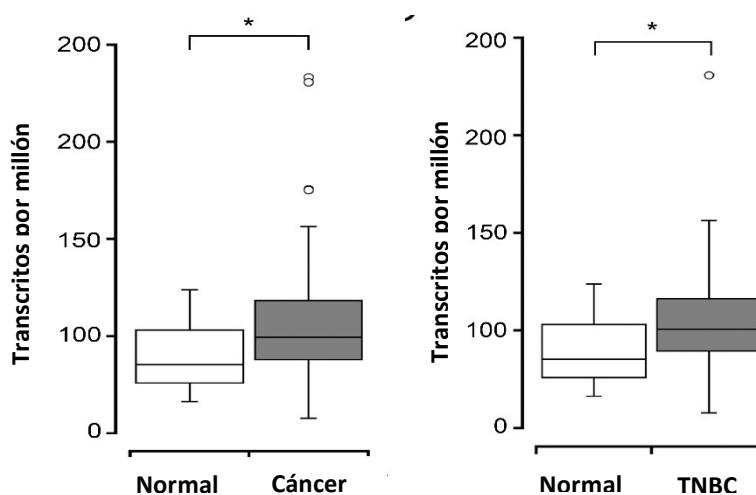


**Figura 44.** Efecto de lncRNA-HAL sobre la tumorigenicidad *In vivo* de la línea MCF-7. En las fotografías de la izquierda se muestran peces que no desarrollaron tumor tras la inyección de células MCF-7 silenciadas para lncRNA-HAL (shHAL-1 y shHAL-2) y células control (shLuc). En la serie de fotografías se muestran peces que si desarrollaron tumor tras la inyección del mismo conjunto de células.

Este conjunto de resultados sugieren que efectivamente lncRNA-HAL tiene un efecto positivo sobre la población de CSC, y este efecto es evidente incluso en modelos In vivo.

### Análisis de la expresión de lncRNA-HAL en tumores de pacientes

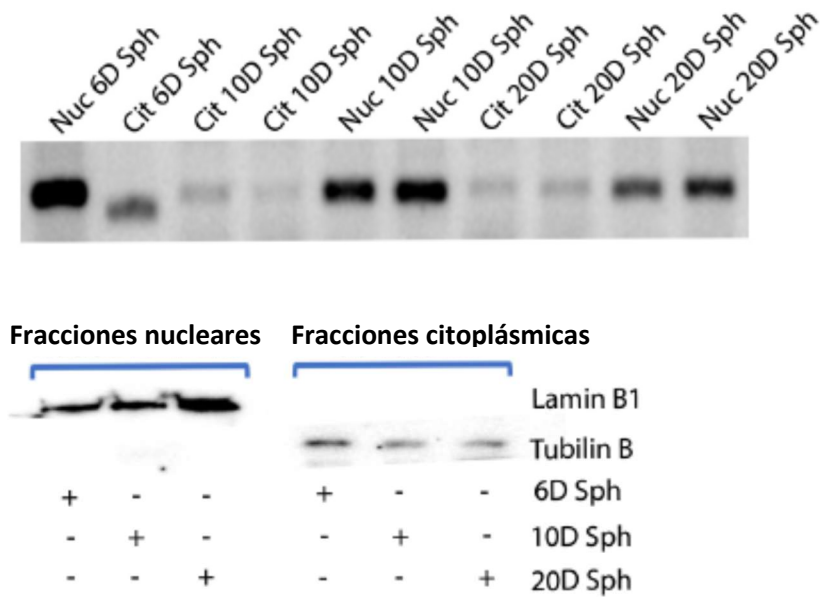
Con la finalidad de determinar si lncRNA-HAL podría estar relacionado con la aparición de la enfermedad o bien con el pronóstico de la misma, decidimos evaluar la expresión de lncRNA-HAL en biopsias de cáncer de mama y tejido normal de pacientes. Para esto se tomaron los resultados de RNA-seq ya publicados de una cohorte de pacientes de cáncer de mama y que se encontraban almacenados en la base de datos de TCGA. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de lncRNA-HAL se encuentra incrementada en muestras de cáncer de mama en comparación con el tejido normal. Así mismo, su expresión se observó principalmente en los tumores mamarios de peor pronóstico que son los tumores triple negativos (TNBC, por sus siglas en inglés) (figura 45).



**Figura 45. Expresión de lncRNA-HAL en muestras de pacientes con cáncer de mama.** Análisis de la expresión de lncRNA-HAL, en datos de RNA-seq publicados en la base de datos del TCGA, en muestras de biopsias de pacientes con cáncer de mama. \* $p < 0.05$ . TNBC: Triple Negative Breast Cancer.

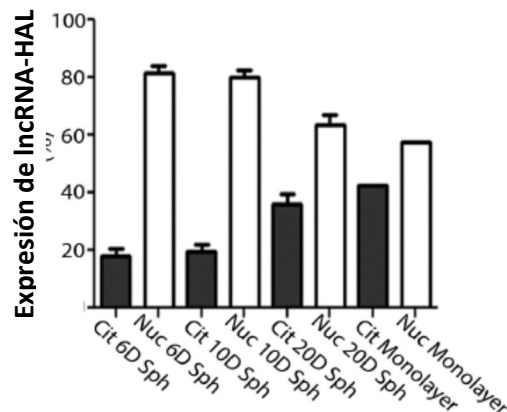
### Localización subcelular del transcrito de lncRNA-HAL.

Con el fin de determinar el posible mecanismo de acción de lncRNA-HAL, decidimos determinar la localización subcelular de este transcrito en el núcleo o en el citoplasma de las células MCF-7. Así mismo nos preguntamos si la habría un cambio en la distribución núcleo-citoplasma durante el crecimiento de los MCTS de la línea MCF-7. Para esto se realizaron fraccionamientos celulares con el fin de separar el contenido citoplásmico del nuclear. Los fraccionamientos se realizaron en células en monocapa y en MCTS de 6, 10 y 20 días. Primero se evaluó la pureza de las fracciones aisladas, para esto se evaluó mediante western blot la proporción de las proteínas  $\alpha$ -tubulina (principalmente citoplásmica) y lamina-B1 (principalmente nuclear). Los resultados obtenidos mostraron que los extractos citoplásmicos y nucleares se encuentran bastante puros y se puede trabajar con ellos adecuadamente (Figura 46).



**Figura 46. Pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas.** En el panel superior se muestra la proporción del transcrito de TBP en las fracciones nucleares y citoplásmica, observándose una proporción mucho mayor en las fracciones citoplásmica. En el panel inferior se muestra el análisis mediante WB de la proporción de la proteína  $\alpha$ -tubulina, la cual como era de esperarse se encuentra más en citoplasma, y de Lamina-B1, la cual se encuentra principalmente en núcleo.

Posteriormente, se analizó la proporción de lncRNA-HAL tanto en núcleo como en citoplasma mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos mostraron que lncRNA-HAL tanto en monocapa como en MCTS presenta una localización principalmente nuclear, así mismo no se observó un cambio significativo en la expresión de lncRNA-HAL tanto en los cultivos en monocapa, como en los MCTS (Figura 47).



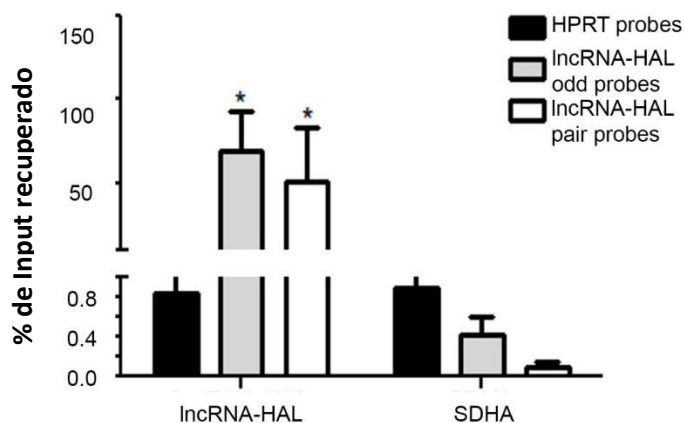
**Figura 47. Localización subcelular de lncRNA-HAL entre núcleo y citoplasma.** Fraccionamiento celular entre núcleo (barra blanca) y citoplasma (barra negra) en células crecidas en monocapa y MCTS de 6, 10 y 20 días de cultivo. La expresión de lncRNA-HAL se evaluó mediante RT-PCR. ANOVA de dos vías.

Los resultados obtenidos sugieren que la localización de lncRNA-HAL podría no ser un mecanismo mediante el cual la función de lncRNA-HAL se regula, es decir, no se obtuvo evidencia que sugiriera que cambios en las características del medioambiente conduzca a cambios en la localización de lncRNA-HAL. Además, lncRNA-HAL puede funcionar a través de procesos nucleares, como la regulación de la transcripción, el splicing alternativo, la remodelación de la cromatina, o la expresión de RNAs ribosomales.

### **lncRNA-HAL interactúa directamente con proteínas nucleares**

Como se observó en experimentos previos, lncRNA-HAL presenta una localización principalmente nuclear, lo cual sugiere que posiblemente participe en la regulación de procesos nucleares. Para comenzar a estudiar la función molecular de lncRNA-HAL decidimos determinar con qué proteína interactúa. Para esto se realizó un ensayo de aislamiento de cromatina por purificación de RNA (ChIRP), el cual permite aislar distintas moléculas unidas físicamente con una molécula de RNA específica, estas moléculas pueden ser, proteínas, fragmentos de DNA y otras moléculas de RNA. Para este ensayo se diseñaron 28 sondas biotiniladas antisentido a la secuencia de lncRNA-HAL, cada sonda de 20 nt estaba dirigida contra una secuencia cada 100 nt de lncRNA-HAL. Las 28 sondas se dividieron en dos mezclas (cada una contiene 14 de las sondas) que se denominaron sondas noes y sondas pares. Como control negativo se diseñaron dos sondas contra el mensajero de HPRT y se juntaron en una sola mezcla. De manera que se tenía un control negativo, el ChIRP contra HPRT, y dos experimentos que servirán de control entre sí, las sondas noes y las sondas pares contra lncRNA-HAL. El resto del procedimiento experimental se detalla en la sección de materiales y métodos.

De las purificaciones realizadas con los ensayos ChIRP se dividieron y una fracción se utilizó para aislar RNA, y otra fracción (la mayor) se utilizó para purificar las proteínas. La purificación de RNA nos permitió demostrar que las sondas contra lncRNA-HAL enriquecían considerablemente, entre un 60-70% en ambas mezclas (pares y noes), el transcrito de lncRNA-HAL con respecto al control Input (lisado completo). En cambio, el juego de sondas contra HPRT no enriqueció el transcrito de lncRNA-HAL con respecto al control Input, se recuperó tan sólo entre un 0.8 y un 1% del transcrito de lncRNA-HAL (Figura 48). Estos resultados indican que la purificación de las proteínas unidas a lncRNA-HAL fue bastante específica y podemos confiar de los resultados obtenidos de la purificación.



**Figura 48. Enriquecimiento del transcrito de IncRNA-HAL por ChIRP.** Análisis del enriquecimiento de IncRNA-HAL mediante RT-qPCR, en el experimento de ChIRP, al usar las mezclas pares (pair probes) y nones (odd probes) de sondas contra IncRNA-HAL y las sondas control contra HPRT. El enriquecimiento se cuantificó como porcentaje del Input recuperado, ya que se tomó la amplificación en el INPUT como un 100% y a partir de este valor se normalizó la amplificación en los ChIRPs. ANOVA de una vía, \* $p < 0.05$ .

Una vez que se validó el enriquecimiento de IncRNA-HAL, se decidió caracterizar la identidad de las proteínas purificadas mediante un ensayo de espectrometría de masas de las proteínas eluidas de cada ChIRP. Para analizar los resultados obtenidos y con el fin de tratar de eliminar el ruido experimental lo mejor posible, se eliminaron las proteínas aisladas en el ChIRP de HPRT de la lista de proteínas eluidas en los ChIRPs de IncRNA-HAL. Pensando que en el control negativo tendríamos proteínas que se unieron a las perlas magnéticas o al RNA mensajero de HPRT. De las listas curadas de las proteínas aisladas con las sondas de IncRNA-HAL, sólo se tomaron como proteínas unidas a IncRNA-HAL aquellas proteínas que estaban presentes en ambas mezclas de sondas, y con porcentajes de cobertura semejantes entre ambos experimentos y las dos réplicas biológicas realizadas. Los resultados obtenidos mostraron que IncRNA-HAL interactúa con distintas histonas, como H2B y H1.1, lo cual sugiere una unión con la cromatina (Figura 49). Además, se observó que IncRNA-HAL también se puede unir a un grupo de proteínas que unen moléculas de RNA conocidas como ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP). Las proteínas identificadas de este grupo son hnRNPD, hnRNPA3 y hnRNPU, las cuales ya se ha observado que unen moléculas de lncRNAs y a través de esta interacción regulan la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional (Figura 49). Otro grupo de proteínas con las que se observó unión, fueron las RNA helicasas de la familia DDX, de las cuales se logró identificar a DDX5 y DDX17 (Figura 49). Estas helicasas también se ha observado unión a otros lncRNAs y su unión está relacionada con la regulación de distintos procesos biológicos nucleares. Finalmente, se identificó la proteína Ran como posible proteína que se une a IncRNA-HAL (Figura 48). Esta unión podría estar relacionada con procesos de importe o exporte nuclear, en los que podría participar IncRNA-HAL.

Protein	MW (kDa)	Peptides (#)	Coverage (%)	Intensity
<b>Histonas</b>				
H2B	13.9	11	65.1	5.33E+09
H1.2	21.6	16	43.2	2.64E+10
<b>hnRNP's</b>				
hnRNPD	23.9	9	38.6	6.35E+09
hnRNPA3	39.6	13	38.6	1.02E+10
hnRNPU	89.0	30	41.8	2.13E+10
<b>RNA Helicasas</b>				
DDX5	69.0	27	51.3	5.10E+09
DDX17	80.4	29	46.4	9.20E+09
<b>Small GTPases</b>				
RAN	26.2	9	39.1	6.12E+09

**Figura 49. Proteínas identificadas unidas a lncRNA-HAL en los experimentos de ChIRP.** Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas en los experimentos de ChIRP de lncRNA-HAL. Se agrupan en 4 familias de proteínas, Histonas, hnRNP's, Helicasas de RNA y GTPases pequeñas. Se muestra además el peso molecular de las proteínas en kDa, el número de péptidos identificados de cada proteína, el porcentaje de cobertura de la secuencia peptídica y la intensidad media de la señal de dichos péptidos.

Los resultados obtenidos muestran que lncRNA-HAL se une a distintas proteínas que previamente han sido descritas como proteínas que se pueden unir a RNAs no codificantes y que se asocian a funciones nucleares de los mismos. En la sección de discusión se abordará con mayor profundidad las funciones que ya han sido reportadas para estas proteínas al unirse a lncRNAs. Sin embargo, aún resta una mayor cantidad de trabajo para poder determinar el mecanismo funcional preciso de lncRNA-HAL en relación con su unión con estas proteínas. Queda por dilucidar en que contextos se puede unir a una u a otra proteína, que conjunto de procesos o genes regula a través de las distintas uniones que se encontraron, si tiene la capacidad de funcionar como guía y facilitar la formación de complejos moleculares funcionales en genes o transcritos blanco, o funcionaría como un señuelo que ante ciertos estímulos inhibe la función de estas proteínas. En relación con la unión a Histonas, es necesario determinar si lncRNA-HAL se une a la cromatina y reconoce secuencias consenso en el DNA o bien a través de marcas postraduccionales de la cromatina.



## CAPITULO V. DISCUSIÓN

El microambiente tumoral juega un papel de suma importancia en el comportamiento de las células cancerosas, este microambiente, en ciertos aspectos hostil, incluye la disminución en la concentración de oxígeno, nutrientes y una acidificación del medio extracelular, lo que favorece la aparición de rasgos fenotípicos más agresivos en las células cancerosas (278). Existe una gran cantidad de datos experimentales que dan constancia de la importancia de distintas proteínas que participan en la respuesta de las células a este microambiente hostil. Sin embargo, hasta el momento existe poca información concerniente a la participación de RNAs no codificantes, en especial de lncRNAs.

En este trabajo se analizó por primera vez la función de lncRNA-HAL en las características fenotípicas relacionadas con la arquitectura tridimensional de los tumores mamarios. Se observó que lncRNA-HAL se sobreexpresa como consecuencia de los eventos microambientales resultantes de una arquitectura tridimensional. Es decir, lncRNA-HAL se expresa preferentemente en células quiescentes, p27 positivas, presentes en las capas internas del esferoide donde la hipoxia y la acidosis son más acentuadas. Además, resultó muy interesante observar el gran dinamismo de las poblaciones del esferoide, en el que encontramos una gran proporción de células saliendo o entrando a G0 (poblaciones doble positivas o negativas para Ki67 y p27), y la posible relación de lncRNA-HAL con esta dinámica. De estas observaciones se desprende la pregunta de si existe la posibilidad de que lncRNA-HAL participe en la entrada y salida de G0 y por lo tanto en la naturaleza dinámica de estas poblaciones. Ciertamente, en la actualidad se sabe poco de estas poblaciones a nivel celular y su impacto en la biología del cáncer, pero derivado de este trabajo, consideramos que los MCTS podrían constituir un modelo adecuado para su estudio molecular y celular.

Se ha evidenciado que en parte la aparición de estas poblaciones quiescentes es resultado de la aparición de regiones hipóxicas y posteriormente acidóticas en el MCTS (279). En este trabajo observamos que la hipoxia, pero no la acidosis, es en parte responsable del incremento de la expresión de lncRNA-HAL. Esto sugiere que la inducción hipóxica de lncRNA-HAL podría estar implicada en la disminución de la proliferación de las células MCF-7, quizá debido a un retraso en la progresión del ciclo celular (por un arresto, como en la población Ki67/p27<sup>+</sup>) o induce un estado quiescente dinámico (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup>, ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup>) (Figura 2A). Es importante mencionar que la participación de lncRNAs en la adquisición de un fenotipo quiescente o en la respuesta a un estímulo hipóxico ha sido ampliamente descrita en diversos estudios. Por ejemplo, GAS5 es un lncRNA, que induce un fenotipo quiescente en células T y en tumores mesoteliales gracias a que funciona como un señuelo del receptor de glucocorticoides (GR) (280, 281). Además, existen diversos reportes de lncRNAs responsivos a hipoxia, como lincRNA-p21 y ENLACE-A (252, 282). Sin embargo, muchos de estos estudios se han enfocado en la participación de estos lncRNAs en el mantenimiento de un fenotipo hipóxico en condiciones de normoxia (ENLACE-A) o la adquisición de un perfil transcripcional que permite sobrevivir a este estrés medio ambiental (lncRNA-p21). En este trabajo, los resultados obtenidos sugieren la participación de lncRNA-HAL en el vínculo funcional que existe entre la hipoxia y la quiescencia, fenómeno que no ha sido descrito en función de lncRNAs. La inducción de lncRNA-HAL en un contexto hipóxico fue parcialmente dependiente de la actividad de HIF-1, ya que el tratamiento con un inhibidor de HIF-1 (2-o-metoxi-estradiol) disminuyó parcialmente la expresión de lncRNA-HAL. Esto puede deberse a que el tratamiento con 2-o-metoxi-estradiol no abate completamente la función de HIF-1, tanto a nivel de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  como de la expresión de sus genes blanco (283-285). Esto se observó en la expresión de lncRNA-HAL y ADM, donde el tratamiento con 2-o-metoxi-estradiol no abatió totalmente su expresión. Otra

posibilidad consiste en que HIF, no es el único factor de transcripción que participa en la respuesta a hipoxia. En hipoxia existe una activación de NF- $\kappa$ B, que se da a través de distintos mecanismos como es la producción de ROS por la mitocondria o la activación directa por la vía Ras/Raf (286, 287). En condiciones de hipoxia media CREB se fosforila en la serina 133 pero en hipoxia severa, la fosforilación de CREB permite su ubiquitinación y posterior degradación, lo que facilita la expresión de genes proinflamatorios (288, 289). La activación de AP-1 en condiciones de hipoxia depende de la activación de JNK (290). Otro factor de transcripción importante en la hipoxia es p53, el cual se activa por la unión directa de HIF con MDM2 (291). Esto implica que en hipoxia la expresión de lncRNA-HAL podría estar regulada por otros factores además de HIF-1.

Uno de los efectos más interesantes de lncRNA-HAL fue su impacto sobre el fenotipo proliferativo de la línea celular MCF-7. En experimentos previos, se observó que lncRNA-HAL se expresa principalmente en poblaciones no proliferativas. Los ensayos de silenciamiento de lncRNA-HAL mostraron que su pérdida de función incrementó la proliferación de las células MCF-7, sin afectar el número de células en apoptosis. A pesar de que la regulación de la adquisición de un fenotipo quiescente resulta de gran relevancia en el estudio de la biología de los tumores, pocos estudios se han enfocado en estudiar la participación de lncRNAs. Se ha observado que la expresión de PAPAS un lncRNA que se localiza antisentido a los genes rRNA regula el silenciamiento de estos genes gracias a la inducción de la metilación de H4K20me3 en células quiescentes (188). El lncRNA H19 se ha asociado con la adquisición de un fenotipo quiescente en células stem pluripotentes, gracias a su papel en el imprinting del gen Igf2 (292). GAS5 regula el arresto en el crecimiento de las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y de mesotelioma. Como lncRNA-HAL, el incremento en la expresión de GAS5 conduce a una disminución en la cantidad de células a través del tiempo, y su inhibición acelera el ciclo celular. La sobreexpresión de GAS5 causó que las células se arrestaran en la fase G0/G1, mientras que disminuía la proporción en la fase S y G2/M, semejante a lncRNA-HAL cuyo silenciamiento incrementó la cantidad de células en G2/M. A diferencia de lncRNA-HAL, GAS5 responde principalmente a una disminución en las señales mitogénicas como privación de suero, o la inhibición de las vías de PI3K/mTOR o Sonic Hedgehog y no a la hipoxia. Además de que GAS5 funciona principalmente como un señuelo para el receptor de glucocorticoides (GR), mientras que lncRNA-HAL utiliza otras moléculas como hnRNP's o DDX5/7 para llevar a cabo sus funciones moleculares (216, 281, 293). lncRNA-HAL podría regular la proliferación y responde a estímulos y utiliza maquinarias moleculares distintos de los ya reportados.

El efecto sobre la proliferación también podría estar asociado con el incremento de una población celular de células transitoriamente amplificadas (TACs). Esta población corresponde a un grupo de células con ciclos celulares relativamente rápidos, que provienen del tránsito de células troncales con ciclos celulares lentos (294). Es posible, que lncRNA-HAL pudiese regular negativamente la transición de las CSC en TAC, por lo que su silenciamiento podría causar un incremento en la población de TACs y una disminución en la poza de las CSC, esto es apoyado por los resultados que muestran que el silenciamiento de lncRNA-HAL causa una disminución en la proporción de CSCs. Esto ha sido descrito en poblaciones de células troncales quiescentes de intestino y epidermis, donde una señal proliferativa como la activación de k-Ras o la disminución de la señalización de Lrig1, conduce a una transición de células troncales a un fenotipo de TAC's (295, 296). La activación de la vía de Myc en cáncer de mama conduce a la activación de vías mitogénicas que inducen la diferenciación de CSC quiescentes en TACs (297). Estos resultados sugieren que lncRNA-HAL podría

regular el fenotipo quiescente de una población específica de CSCs, y su disminución podría inducir la diferenciación a un fenotipo de TACs.

Este efecto de lncRNA-HAL sobre la proliferación de las células MCF-7 también se observó en los cultivos de MCTS en la forma de un incremento en el diámetro de los esferoides. Previamente ya se había demostrado una asociación entre el tamaño del esferoide y la cantidad de células quiescentes (95). En los esferoides, lncRNA-HAL comienza a expresarse conforme aparecen regiones hipóxicas, lo que se relaciona con la aparición de fenotipos no proliferativos. Esto sugiere que la disminución artificial de lncRNA-HAL en las regiones hipóxicas podría causar una disminución en la población de células quiescentes y un aumento en la población proliferativa y ocasiona un incremento en las dimensiones del esferoide.

La quiescencia es un fenotipo celular que se ha asociado fuertemente a las poblaciones de células troncales tumorales (298). Se conoce que la inhibición farmacológica de HIF-1 $\alpha$  disminuye la proporción de CSCs en tumores mamarios, además, de que la hipoxia induce fenotipos más agresivos en distintas líneas de cáncer de mama (299, 300). Diversos reportes en varios tumores indican la existencia de una población quiescente de CSCs, la cual es importante para la reincidencia del tumor, la formación de focos metastásicos, y finalmente la resistencia a la terapia quimioterapéutica (301). Se ha observado que la mayoría de las células troncales de la glándula mamaria y tumores mamarios son quiescentes (298). Además, se ha observado que existen dos poblaciones mayoritarias de CSCs de mama: Una población con fenotipo mesenquimal, quiescente y que usualmente se localiza en los frentes migratorios de los tumores y en regiones hipóxicas, que se caracteriza por tener el inmunofenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Otra población de CSCs con un fenotipo epitelial, la cual se ha descrito como proliferativa, y que se localiza en regiones internas al tumor, las cuales se caracterizan por la expresión del marcador Aldh<sup>+</sup>. Además, existe una plasticidad entre estos fenotipos que permite la transición de CSCs mesenquimales a epiteliales y viceversa (277). Esto resulta interesante, porque la población stem que se estudió en este trabajo (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>), es una población quiescente, que se asocia con la formación de focos metastásicos y la sobrevivencia al tratamiento farmacológico. Por este motivo, distintos abordajes farmacológicos han buscado eliminar específicamente la población de células tumorales quiescentes y CSC quiescentes (302-304). En este trabajo, usando tanto ensayos *in vitro* como *in vivo*, se mostró que la expresión alta de lncRNA-HAL se asocia con el fenotipo troncal de la población CSC de la línea MCF-7. La inhibición de lncRNA-HAL condujo a una disminución en la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> de la línea MCF-7, así como una disminución en la expresión de marcadores de troncalidad como NANOG, Sox2 y Aldh1A3. Además, se observó que el silenciamiento de lncRNA-HAL causó un incremento en la expresión del mRNA de CD44, pero en los ensayos de citometría se observó una tinción membranal menor para dicha proteína, así como un incremento en la presencia membranal de CD24. Esta diferencia (en la cantidad de mRNA y proteína de CD44) se podría explicar por la regulación postranscripcional de CD44 (305). La localización membranal de CD44 se regula mediante la selección de sitios de poliadenilación alternativos, CD44 tiene dos sitios de poliadenilación que generan transcritos con una región 3'UTR larga o corta. El mRNA con 3'UTR larga contiene elementos que inducen una localización membranal; en cambio, el mRNA con 3'UTR corta carece de estas señales y produce una proteína localizada en el aparato de Golgi (306). Esto podría explicar la disminución paradójica en la cantidad de proteína y el incremento en la expresión del mRNA de CD44. Esta diferencia también se podría explicar en función de miRNAs, tanto miR-708-5p como miR-145 pueden regular

la expresión de CD44 en distintos tumores (307, 308). El incremento en la expresión de estos miRNAs conduce a una disminución en el potencial tumorigénico, semejante a lo observado con la inhibición de lncRNA-HAL. Sin embargo, en el presente trabajo, no se evaluó la función de moléculas reguladoras como miRNAs río abajo de lncRNA-HAL, o bien los posibles cambios estructurales en el mensajero y proteína de CD44 derivados de la función de lncRNA-HAL.

Otro de los procesos biológicos en los que se observó que lncRNA-HAL influía fue en la migración e invasión de las células MCF-7. El análisis de IPA mostró que PLAU y TNC podrían ser de los principales reguladores del efecto de lncRNA-HAL sobre la migración. El gen PLAU codifica para el activador de plasminógeno semejante a urokinasa (uPA), una proteasa extracelular que constituye un activador celular del plasminógeno, así como de TGF- $\beta$  (309, 310). Se ha observado que la adquisición del fenotipo de EMT usualmente se acompaña de un incremento en uPA y uPAR (311, 312). Además, el uso de moléculas inhibitorias de uPA disminuyen la migración, invasión, proliferación y crecimiento clonogénico (313, 314). Por otro lado, Tenascina C (TNC) es una proteína de la matriz extracelular que se ha observado en nichos de células troncales, además de que la secreción de isoformas largas de esta proteína se asocia con un estadio más avanzado de cáncer de mama (315). En células MCF-7, el tratamiento con TNC conduce a la activación de Src que a su vez fosforila a FAK, esto ocasiona el inicio de un proceso de EMT, en el que se disminuyó la adhesión célula-célula e incrementó la migración celular (316). En los ensayos realizados, se observó que el silenciamiento de HAL conducía a un incremento en la capacidad de degradación de la matriz extracelular, lo cual era de esperarse tras el incremento en la expresión de PLAU, pero conducía también a una disminución en la capacidad de migración de la línea MCF-7. Sugieren que un incremento en la expresión de lncRNA-HAL podría conducir a un fenotipo migrador pero que no degrada la matriz extracelular. Este fenómeno es conocido como migración no proteolítica, se han descrito dos principales mecanismos de migración, una basada en la degradación de la ECM en la región pericelular y con movimientos mesenquimales (llamada migración proteolítica) y otra migración que no utiliza proteasas para degradar la matriz y que recae en un movimiento ameboide en el que las células pasan rápidamente por huecos en la matriz (migración no proteolítica) (317-319).

Los resultados obtenidos mostraron que la disminución de la expresión de lncRNA-HAL incrementó la supervivencia de las células MCF-7 en condiciones de hipoxia y de ausencia de suero. Durante el insulto hipóxico, la activación del factor de transcripción HIF-1 conduce a la expresión de genes que son necesarios para la supervivencia de las células al estrés hipóxico. Se ha reportado que HIF-1 también induce la expresión de IGFBP-3 (proteína de unión a IGF 3), una proteína que bloquea la señalización de IGF (factor de crecimiento semejante a insulina) y conduce a una inhibición del crecimiento celular (320). También se ha reportado la función de lncRNAs que regulan la apoptosis y el arresto en el ciclo celular tras un insulto hipóxico. Por ejemplo, GAS5 participa en el proceso apoptótico y el arresto proliferativo resultante de la hipoxia. En distintos modelos de estrés hipóxico se ha demostrado que el silenciamiento de GAS5 conduce a un incremento en la supervivencia de las células (321-323). Esto podría sugerir que lncRNA-HAL podría ser un gen con funciones duales, ya que regularía negativamente la supervivencia a condiciones de estrés como se ha reportado para GAS5, pero participa en un fenotipo bastante interesante y que se considera de suma importancia para la progresión de los tumores que es el de las CSCs.

Como ya se ha descrito, los resultados obtenidos apuntan a una función de lncRNA-HAL sobre el fenotipo de una población de CSCs quiescente, pero para corroborar esto resultaba necesario

evidenciar un efecto sobre la tumorigenicidad de la línea MCF-7 *In vivo*. Como recipiente de xenotrasplantes *In vivo*, decidimos utilizar al organismo modelo *Danio rerio* (pez zebra), el cual ha sido ampliamente utilizado para realizar ensayos de xenotrasplantes de distintas células tumorales tanto de humano como de ratón (324). El pez zebra tiene distintas ventajas como modelo de xenotrasplantes, dada la facilidad para su cuidado y manipulación se pueden realizar ensayos utilizando decenas o cientos de individuos, además los embriones son transparentes por lo que la visualización de las células se puede hacer con un microscopio simple, los embriones desarrollan su sistema inmune hasta el día 11 (325). Según lo ya reportado el ensayo adecuado para evidenciar una disminución o un incremento en la población de células iniciadoras de tumor (CSCs) es el ensayo de dilución limitante, este ensayo se ha realizado ampliamente en pez zebra y para medir autorrenovación o tumorigenicidad generalmente se cuantifica el número de peces que desarrollan tumores (con diluciones mayores, disminuye su número) o bien el tamaño de los tumores respecto al tiempo. En el presente trabajo se decidió cuantificar la proporción de peces que desarrollaron tumores. Los resultados obtenidos mostraron que el silenciamiento de HAL ocasiona una disminución en la tumorigenicidad de la línea MCF-7. Esto concuerda con los resultados que indican que el silenciamiento de lncRNA-HAL conduce a una disminución en la proporción de CSCs y como era de esperarse a una disminución en la cantidad de células que pueden iniciar un tumor. En estudios previos, se ha demostrado que un incremento en la cantidad de CSCs, como ocurre al crecer la línea MCF-7 como MCTS, incrementa la cantidad de peces que desarrollan tumor (326).. Este fenómeno también se apoya en los datos de tumores en pacientes, donde existe una mayor expresión de lncRNA-HAL en los tejidos tumorales respecto a tejidos normales, y una mayor expresión en tumores triple negativo (TNBC). Se ha reportado previamente que los tumores triple negativo, que se consideran como el subtipo de tumores mamarios con mayor agresividad y peor pronóstico, presentan una proporción mayor de células troncales (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>), lo que correspondería posiblemente con una mayor expresión de lncRNA-HAL (327-329).

Con el fin de estudiar el posible mecanismo funcional de lncRNA-HAL, se decidió analizar mediante un ensayo de ChIRP las proteínas con las que interactúa lncRNA-HAL. Los resultados mostraron que lncRNA-HAL puede interactuar con distintas proteínas. Las cuales podemos agruparlas en 4 grupos: Histonas (H2B y H1.2), hnRNP's (hnRNPD, hnRNPU y hnRNPA3), Helicasas de RNA (DDX5 y DDX17) y GTPasas pequeñas (RAN). Interesantemente, todas las proteínas con las cuales se observó una interacción de lncRNA-HAL son proteínas con una localización principalmente nuclear (330-332). En el caso de las helicasas de RNA DDX5 y DDX17, ambas presentan una localización nuclear y funcionan como un heterodímero (333). Lo anterior concuerda con la localización preferentemente nuclear de lncRNA-HAL.

Con respecto a las proteínas con las que interactúa lncRNA-HAL, podemos observar que la interacción de este transcrito con las histonas H2B y H1.2 parecería sugerir una unión directa con cromatina (334). Interesantemente, H1.2 se ha asociado previamente con regiones de cromatina transcripcionalmente reprimida en dominios conocidos como asociados a lamina (LADs, Lamin associated domains), en este contexto se ha asociado a H1.2 como un regulador de la progresión del ciclo celular (335). Esta interacción sugeriría que lncRNA-HAL podría estar implicado en la represión de algunos genes blanco, quizá gracias a su localización en dominios represivos. Además, lncRNA-HAL podría interactuar con tres proteínas de unión a RNA, hnRNPU, hnRNPD y hnRNPA3. En el caso de hnRNPU, esta tiene distintas funciones celulares, ya que participa tanto en el

procesamiento de los transcritos primarios, en la transcripción de genes blanco y también en la estructuración de distintos dominios de cromatina al funcionar como una proteína de andamiaje entre la matriz nuclear y los cromosomas (336). hnRNPU se asocia principalmente a regiones de eucromatina unidas a la matriz nuclear (337). hnRNPU puede interactuar con diversos lncRNAs y la función molecular depende en gran medida del transcrito con el que interactúe. Se ha observado que hnRNPU interactúa directamente con Xist, y esta interacción es necesaria para que Xist se dirija a sus regiones blanco en el cromosoma X inactivo (338). En el caso del lncRNA FIRRE, su interacción con hnRNPU le permite facilitar la unión inter-cromosómica entre un dominio del cromosoma X y otras 5 regiones en distintos cromosomas, esta función resulta semejante a la reportada para el caso de Xist (339). Además, en macrófagos estimulados con LPS la activación de NF- $\kappa$ B conduce a la expresión de FIRRE, el cual en este contexto al interactuar con hnRNPU se une a los elementos ricos en AU de diversos mRNA de genes proinflamatorios y aumenta su estabilidad (340). Este trabajo sugiere que la interacción de hnRNPU con distintos lncRNA le permitiría seleccionar ciertas poblaciones de mRNAs y regular de esta manera su estabilidad. Así mismo, en tejido adiposo pardo, se ha demostrado que hnRNPU interactúa con Blnc1 (un lncRNA), funciona como una molécula de andamiaje que permite la unión con los factores de transcripción EBF2 y Zbtb7b e inducir así la diferenciación en tejido adiposo marrón (341, 342). Estos resultados sugieren que hnRNPU funcionaría como una molécula de andamiaje entre un lncRNA y otras proteínas, y a través de la formación de estos complejos participa en la regulación de procesos como la formación de dominios cromosómicos, regulación de la estabilidad de algunos mRNAs y la regulación de la actividad y blancos de factores de transcripción. En el caso de lncRNA-HAL, hnRNPU podría funcionar como una molécula de andamiaje que permite su interacción con otras proteínas o RNAs.

En el caso de la proteína de unión a RNA hnRNPD se sabe que es una proteína de unión a RNA también conocida como AUF1 (ARE/poly(u)-binding/degradation factor 1) que regula el decaimiento de mRNAs como BCL-2 (343). Sin embargo, poco se ha descrito de su función al unirse a distintos lncRNAs. En colon se ha observado que lnc13 opera como un lncRNA que reprime la expresión de distintos genes proinflamatorios, esta función represora la realiza uniéndose directamente a hnRNPD el cual funciona como una molécula de andamiaje que le permite a lnc13 reclutar a HDAC1 a los promotores de sus genes blanco (344). La unión de hnRNPD con el lncRNA ASNR inhibe su función de inducir el decaimiento del mRNA de Bcl-2, al secuestrar a hnRNPD en el núcleo (343). Este mismo mecanismo se ha reportado para la interacción de hnRNPD con LINC01354, que incrementa la expresión del mRNA de B-catenina (345). En este caso hnRNPD, semejante a lo que ocurre con hnRNPU, también funciona como una molécula de andamiaje que permite la formación de complejos ribonucleoproteicos con otras proteínas efectoras y de esa manera regular la transcripción o la estabilidad de mRNAs blanco. Por lo que también podría ser una proteína de andamiaje para lncRNA-HAL, que podría funcionar regulando negativamente la estabilidad de ciertos mRNAs.

En el caso de hnRNPA3, no se ha reportado hasta el momento una interacción con alguna molécula lncRNA. Por lo que resultaría difícil intentar sugerir una posible función biológica para esta proteína. Se ha reportado que hnRNPA3 puede unirse a los repetidos teloméricos y funcionar como un regulador negativo de su alargamiento (346). Sin embargo, se requeriría realizar ensayos sobre la longitud de los telómeros al modificar la expresión de lncRNA-HAL, para poder tener una idea clara de la posible función de la interacción con hnRNPA3.

En el caso de las RNA helicasas DDX5 y DDX17, estas generalmente forman un heterodímero y cumplen distintas funciones celulares, principalmente como coactivadores transcripcionales de distintos factores de transcripción (333, 347). Se ha reportado que DDX5/DDX17 pueden interactuar con distintos lncRNAs. SRA (RNA activador de receptores nucleares de esteroides) es el lncRNA que interactúa con DDX5/DDX17 que más se ha estudiado hasta el momento. Se ha descrito que SRA a través de la formación de un complejo que comprende a DDX5/17, el dominio intracelular de Notch y p300, puede incrementar la respuesta transcripcional de la señalización de la vía Notch (348). En la diferenciación miogénica de las células C2C12 se ha demostrado que el complejo SRA con DDX5/17 puede servir como un transactivador del factor de transcripción MyoD (349). Un fenómeno interesante observado en la función de SRA es que este lncRNA puede interactuar con los complejos TrxG (Tritorax, complejo activador transcripcional) y PRC2 (Complejo represivo Polycomb 2), sin embargo, la unión con DDX5 facilita la unión de DDX5 con SRA, pero no la de PRC2. Lo que sugiere que la unión con DDX5 puede definir entre distintos tipos de complejos de SRA, uno activador y otro represor (350). Otro lncRNA que se ha reportado que puede interactuar con DDX5/17 es mrhl (locus hotspot de recombinación meiótica), el cual funciona como un regulador negativo de la vía Wnt en células de espermatogonia, se desconoce el mecanismo que desempeña el complejo mrhl con DDX5/17 pero se sabe que esta unión es necesaria para la localización de mrhl en la cromatina (351). En el caso de la unión de DDX17 con el lncRNA MeXis (secuencia inducida por LXR expresada en macrófagos), se sabe que este complejo ribonucleoproteico permite la activación transcripcional de distintos genes blanco de LXR, en especial aquellos asociados a la homeostasia del colesterol (352). Estos resultados sugieren que DDX5/DDX17 pueden interactuar con distintos lncRNAs con el fin de regular la expresión de sus genes blanco. Esta regulación transcripcional parecería poder ser realizada directamente por el complejo lncRNA-DDX5/17, o bien gracias a la función de molécula de andamiaje del lncRNA que permite la formación de un complejo que incluye a DDX5/17 con otros factores de transcripción como Notch, p53 o MyoD. En el caso de lncRNA-HAL es posible que DDX5/17 podría ser una molécula que funcione directamente en complejo con lncRNA-HAL, o bien que permita a lncRNA-HAL unirse o no a las diferentes proteínas reportadas aquí, como ocurre con la unión de SRA con TrxG o PRC2.

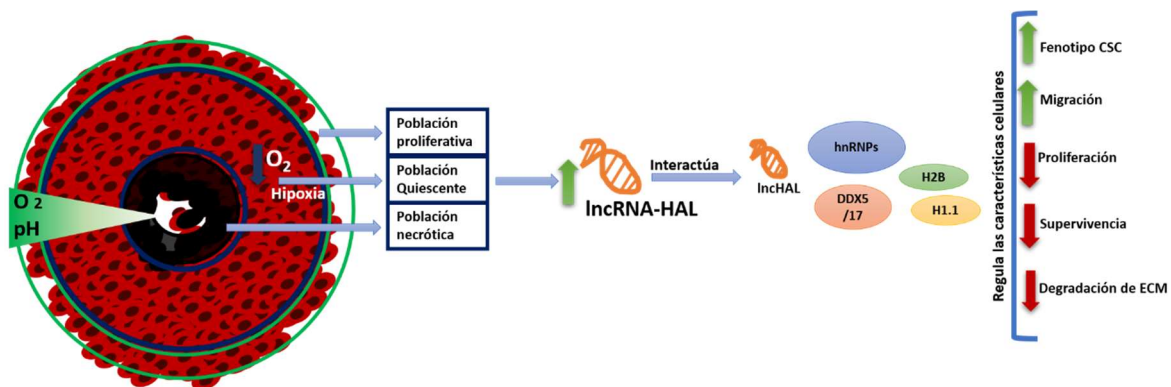
Estos datos de otros grupos de investigación sugieren distintos fenómenos respecto a las moléculas con las que se une lncRNA-HAL. Primero, se sabe que estas moléculas pueden funcionar directamente como efectores de distintos lncRNAs y regula tanto la expresión de distintos genes blanco como la estabilidad de sus mRNAs. Esto implica que lncRNA-HAL puede formar distintos complejos ribonucleoproteicos, unos que incluyan a las distintas hnRNPs y otros a las RNA helicasas, o bien un complejo ribonucleoproteico en el que el lncRNA-HAL funcione como molécula de andamiaje que permite la interacción de las hnRNPs con las RNA helicasa DDX5/17 y de esta manera regular procesos específicos que requieran estas dos funciones. Basados en lo reportado de estudios previos de interacciones con lncRNAs y estas moléculas, podríamos pensar que los complejos de lncRNA-HAL con hnRNP's y DDX5/17 podrían regular la transcripción de distintos genes blanco, esto basado en la interacción con histonas que sugeriría una unión directa a la cromatina. Pero, también podemos pensar en que la interacción de lncRNA-HAL con estas proteínas también podría regular la estabilidad de distintos mRNAs. Por otro lado, la posibilidad de que lncRNA-HAL se comporte como una molécula señuelo que secuestre en el núcleo a las proteínas hnRNPs y DDX5/17, impidiéndoles de esta manera llevar a cabo sus funciones citoplásmica es también bastante plausible. Sin embargo, con la información experimental con la que contamos hasta este momento

no permite más que sugerir de manera especulativa una posible vía de acción de lncRNA-HAL a través de sus proteínas compañeras. En este punto, es muy importante ser conscientes de que resta aún mucho trabajo experimental para poder definir un mecanismo de acción de lncRNA-HAL los complejos ribonucleoproteicos que podría formar con las proteínas aquí reportadas.



## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se describió por vez primera la función biológica de lncRNA-HAL en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Se demostró que lncRNA-HAL incrementa su expresión en el modelo de cultivo tridimensional de MCTS; los ensayos en condiciones de hipoxia, acidosis y mediante la inhibición de la actividad transcripcional de HIF1 demostraron que lncRNA-HAL responde al estímulo hipóxico que se presenta en los esferoides y es en parte regulado por el factor de transcripción HIF. La expresión de lncRNA-HAL se encuentra enriquecida en la población de células quiescentes o no proliferativas que se localizan en las regiones centrales hipóxicas que se generan en el cultivo de los MCTS. Los ensayos de pérdida de función de lncRNA-HAL mostraron que el silenciamiento de este gen conduce a un incremento en la proliferación de las células MCF-7, un fenotipo no migratorio, pero que degrada matriz extracelular y una disminución en la población de células troncales tumorales de la línea MCF-7. Estos resultados sugieren que la expresión hipóxicas de lncRNA-HAL participa en la modulación de un fenotipo particular que correspondería al de una población quiescente de células troncales tumorales. La función de lncRNA-HAL se encuentra mediada por la acción de proteínas nucleares, mostramos que lncRNA-HAL se une a histonas, lo que sugeriría una unión directa con la cromatina. Además, sabemos que lncRNA-HAL puede interactuar con distintas ribonucleoproteínas (hnRNPU, hnRNPD y hnRNPA3) y con las RNA helicasas DDX5/DDX17. Estas proteínas ya se han reportado como compañeros funcionales de distintos lncRNAs donde funcionan principalmente como reguladores transcripcionales o de la estabilidad postranscripcional de distintos mRNAs blanco.



**Figura 50. Conclusiones.** Se muestran los principales resultados obtenidos en el presente trabajo. lncRNA-HAL se expresa en la población de células no proliferativas, así como en las CSC's, de los cultivos de MCTS en respuesta a la hipoxia que en ellos se presenta. La unión de lncRNA-HAL con las proteínas H1.2., H2B, hnRNPU, hnRNPD y DDX5/17 le permite regular la expresión de distintos genes blanco e inducir un fenotipo de células no proliferativas, con características de CSC's que migran de una manera no proteolítica.

## CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS

Como perspectivas al presente trabajo, se propone analizar la posible interacción del gen lncRNA-HAL con su gen hospedero MNT. Para esto es necesario definir con precisión las fronteras del transcrito de lncRNA-HAL mediante ensayos de 3'RACE y 5'RACE. Además, delimitar las regiones regulatorias de lncRNA-HAL y determinar si su delección o modificación impacta únicamente la

expresión de lncRNA-HAL y no de MNT. También sería conveniente mantener en mente a MNT durante los consiguientes análisis funcionales y moleculares de lncRNA-HAL.

Otro punto importante, consiste en determinar de manera mecánica como ocurre la interacción de lncRNA-HAL con hnRNPD, hnRNPE, hnRNPA3, DDX5/17, es decir si todas estas moléculas se unen formando un solo complejo, o bien formando distintos complejos, y si la formación de un complejo excluye la formación de otros. Así mismo, sería conveniente determinar la localización nuclear de dichos complejos, mediante ensayos de inmunofluorescencia, localizando con un anticuerpo a alguna de las proteínas, y mediante la expresión exógena de una quimera de lncRNA-HAL con el dominio de RNA fluorescente spinach, determinar dónde co-localizan dichos complejos. Posteriormente, es necesario determinar en qué manera la unión de lncRNA-HAL con estas proteínas modifica su actividad enzimática o función, o bien si los dirige a ciertos blancos en lugar de modular sólo la actividad. Para esto sería conveniente determinar si lncRNA-HAL también se encuentra unido a otras moléculas de DNA o de RNA, para pensar en hacer un análisis más robusto de dichos blancos, como un ensayo de ChIRP pero aislando DNA y RNA en lugar de proteína.

Finalmente, al tener los blancos de lncRNA-HAL y su acción sobre las proteínas con las que interactúa, sería necesario determinar como la modulación de estos blancos, conduce al fenotipo quiescente, o bien al fenotipo de CSC quiescente.

## CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

1. Wagener DJT. The history of oncology. *Bohn Stafleu van Loghum*. 2009:302.
2. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(10):a003236.
3. D. J. Kerr DGH, C. J. H. van de Velde, and M. Baumann. *Oxford Textbook of Oncology*. Oxford University Press. 2016.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
5. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(21):10238-41.
6. Salud Sd. Estadísticas de Cáncer de mama en México. <https://www.gobmx/salud/documentos/estadisticas-cancer-de-mama?state=published>. 2015.
7. Arce C. BE, Villaseñor Y., Gamboa C., Lara F., Pérez-Sánchez V. y Villareal P. Oncoguía: cáncer de mama. *Cancerología*. 2011;6:77-86.
8. Cárdenas-Sánchez J, Bargallo-Rocha, E., Erazo-Valle, A., Maafs-Molina, E., Poitevin-Chacón, A. Consenso Mexicano de cáncer mamario: Quinta revisión. Secretaría de Salud. 2013.
9. Uscanga-Sánchez S, Torres-Mejía, G., Ángeles-Llerenas, A., Domínguez-Malpica, R., Lazcano-Ponce, E. Indicadores del proceso de tamizaje de cáncer de mama en México: un estudio de caso. *Salud Pública Mex*. 2014;56(5):10.
10. Howlett AR, Bissell MJ. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol*. 1993;2(2):79-89.

11. Djonov V, Hogger K, Sedlacek R, Laissue J, Draeger A. MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *J Pathol.* 2001;195(2):147-55.
12. Sternlicht MD, Barsky SH. The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med Hypotheses.* 1997;48(1):37-46.
13. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation.* 2002;70(9-10):537-46.
14. Gyorki DE, Asselin-Labat ML, van Rooijen N, Lindeman GJ, Visvader JE. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R62.
15. Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(8):1221-35.
16. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207-14.
17. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408.
18. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-17.
19. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem.* 2009;284(25):16767-75.
20. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 2000;60(15):4010-5.
21. Chouaib S, Messai Y, Couve S, Escudier B, Hasmim M, Noman MZ. Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Front Immunol.* 2012;3:21.
22. Wong CC, Gilkes DM, Zhang H, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(39):16369-74.
23. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47.
24. Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, et al. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(5):646-53.
25. Lin S, Sun L, Hu J, Wan S, Zhao R, Yuan S, et al. Chemokine C-X-C motif receptor 6 contributes to cell migration during hypoxia. *Cancer Lett.* 2009;279(1):108-17.
26. Chaturvedi P, Gilkes DM, Takano N, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(20):E2120-9.
27. Gilkes DM, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, et al. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res.* 2013;11(5):456-66.
28. Semenza GL. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(3):382-91.
29. Yang N, Liu C, Peck AR, Gironde MA, Yanac AF, Tran TH, et al. Prolactin-Stat5 signaling in breast cancer is potently disrupted by acidosis within the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2013;15(5):R73.
30. Gupta SC, Singh R, Pochampally R, Watabe K, Mo YY. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-kappaB pathway. *Oncotarget.* 2014;5(23):12070-82.

31. Asmaa E, El-Kenawi, Arig A., Hashim I, Luddy KA, Shari A, et al. Extracellular acidosis alters polarization of macrophages. *Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. 2015;18-22.
32. Lochter A, Bissell MJ. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 1995;6(3):165-73.
33. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(6):430-9.
34. Kim BG, Gao MQ, Choi YP, Kang S, Park HR, Kang KS, et al. Invasive breast cancer induces laminin-332 upregulation and integrin beta4 neoexpression in myofibroblasts to confer an anoikis-resistant phenotype during tissue remodeling. *Breast Cancer Res*. 2012;14(3):R88.
35. Carpenter PM, Dao AV, Arain ZS, Chang MK, Nguyen HP, Arain S, et al. Motility induction in breast carcinoma by mammary epithelial laminin 332 (laminin 5). *Mol Cancer Res*. 2009;7(4):462-75.
36. Ilunga K, Nishiura R, Inada H, El-Karef A, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, et al. Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(6):373-9.
37. Wang C, Gao C, Meng K, Qiao H, Wang Y. Human adipocytes stimulate invasion of breast cancer MCF-7 cells by secreting IGFBP-2. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119348.
38. Bulun SE, Price TM, Aitken J, Mahendroo MS, Simpson ER. A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(6):1622-8.
39. Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(3):1102-7.
40. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):589-97.
41. Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol*. 2012;40(1):130-8.
42. Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):841-9.
43. Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, et al. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron*. 2009;2(1):9-21.
44. Wang TN, Albo D, Tuszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery*. 2002;132(2):220-5.
45. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 10):2143-53.
46. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
47. Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, et al. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. *Cell Cycle*. 2010;9(12):2412-22.
48. Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N, et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature*. 2009;461(7267):1084-91.

49. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):303-15.
50. Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol.* 2000;190(4):430-6.
51. Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Chen J, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell.* 2011;19(4):541-55.
52. Vo AT, Millis RM. Epigenetics and breast cancers. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:602720.
53. Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Perez JC, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S. Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(3):541-51.
54. Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biology International.* 1999;23(3):157-61.
55. Inch WR, McCredie JA, Sutherland RM. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth.* 1970;34(3):271-82.
56. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971;46(1):113-20.
57. Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984;95:24-49.
58. Green SK, Francia G, Isidoro C, Kerbel RS. Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(2):149-59.
59. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol.* 2007;31(6):1403-13.
60. Ballangrud AM, Yang WH, Dnistrian A, Lampen NM, Sgouros G. Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids. *Clin Cancer Res.* 1999;5(10 Suppl):3171s-6s.
61. Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Jr., Ruff LE, et al. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2071-80.
62. Kondo J, Endo H, Okuyama H, Ishikawa O, Iishi H, Tsujii M, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(15):6235-40.
63. Shimazui T, Schalken JA, Kawai K, Kawamoto R, van Bockhoven A, Oosterwijk E, et al. Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2004;11(2):357-60.
64. Somasiri A, Wu C, Ellchuk T, Turley S, Roskelley CD. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for adherens junction-dependent mammary epithelial cell spheroid formation. *Differentiation.* 2000;66(2-3):116-25.
65. Sternemalm J, Geimer S, Frikstad KA, Schink KO, Stokke T, Patzke S. CSPP-L Associates with the Desmosome of Polarized Epithelial Cells and Is Required for Normal Spheroid Formation. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134789.
66. Hamilton G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* 1998;131(1):29-34.
67. Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1984;44(7):3090-7.
68. Glimelius B, Norling B, Nederman T, Carlsson J. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS.* 1988;96(5):433-44.

69. Paulus W, Huettner C, Tonn JC. Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int J Cancer*. 1994;58(6):841-6.
70. Davies CD, Muller H, Hagen I, Garseth M, Hjelstuen MH. Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures. *Anticancer Res*. 1997;17(6D):4317-26.
71. Goodman TT, Olive PL, Pun SH. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(2):265-74.
72. Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Munoz-Galindo L, Lizarraga-Sanchez F, Favela-Orozco A, Chavez-Gutierrez E, et al. miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim Biophys Acta*. 2017.
73. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988;240(4849):177-84.
74. Riffle S, Pandey RN, Albert M, Hegde RS. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*. 2017;17(1):338.
75. Raleigh JA, Miller GG, Franko AJ, Koch CJ, Fuciarelli AF, Kelly DA. Fluorescence immunohistochemical detection of hypoxic cells in spheroids and tumours. *Br J Cancer*. 1987;56(4):395-400.
76. Miller GG, Best MW, Franko AJ, Koch CJ, Raleigh JA. Quantitation of hypoxia in multicellular spheroids by video image analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16(4):949-52.
77. Riffle S, Hegde RS. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):102.
78. Carlsson J, Acker H. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer*. 1988;42(5):715-20.
79. Koshkin V, Ailles LE, Liu G, Krylov SN. Metabolic Suppression of a Drug-Resistant Subpopulation in Cancer Spheroid Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117(1):59-65.
80. Sutherland R, Freyer J, Mueller-Klieser W, Wilson R, Heacock C, Sciandra J, et al. Cellular growth and metabolic adaptations to nutrient stress environments in tumor microregions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1986;12(4):611-5.
81. Sauer H, Ritgen J, Hescheler J, Wartenberg M. Hypotonic Ca<sup>2+</sup> signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids. *J Cell Physiol*. 1998;175(2):129-40.
82. Laurent J, Frongia C, Cazales M, Mondesert O, Ducommun B, Lobjois V. Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer*. 2013;13:73.
83. Tindall MJ, Dyson L, Smallbone K, Maini PK. Modelling acidosis and the cell cycle in multicellular tumour spheroids. *J Theor Biol*. 2012;298:107-15.
84. LaRue KE, Khalil M, Freyer JP. Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2004;64(5):1621-31.
85. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophys J*. 2014;107(8):1821-8.
86. Wartenberg M, Fischer K, Hescheler J, Sauer H. Modulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by cell cycle inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1589(1):49-62.
87. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*. 2016;34(8):1427-41.

88. Sutherland RM, Eddy HA, Bareham B, Reich K, Vanantwerp D. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5(8):1225-30.
89. Wibe E. Resistance to vincristine of human cells grown as multicellular spheroids. *Br J Cancer.* 1980;42(6):937-41.
90. Nederman T. Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Res.* 1984;44(1):254-8.
91. Durand RE. Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in multicell spheroids in vitro. *Cancer Res.* 1981;41(9 Pt 1):3495-8.
92. Durand RE. Chemosensitivity testing in V79 spheroids: drug delivery and cellular microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 1986;77(1):247-52.
93. Tofilon PJ, Buckley N, Deen DF. Effect of cell-cell interactions on drug sensitivity and growth of drug-sensitive and -resistant tumor cells in spheroids. *Science.* 1984;226(4676):862-4.
94. Sano Y, Hoshino T, Bjerkvig R, Deen DF. The relative resistance of non-cycling cells in 9L multicellular spheroids to spirohydantoin mustard. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983;19(10):1451-6.
95. Mellor HR, Ferguson DJ, Callaghan R. A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer.* 2005;93(3):302-9.
96. St Croix B, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med.* 1996;2(11):1204-10.
97. Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* 2003;17(3):503-5.
98. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 2002;62(12):3387-94.
99. Kim JW, Ho WJ, Wu BM. The role of the 3D environment in hypoxia-induced drug and apoptosis resistance. *Anticancer Res.* 2011;31(10):3237-45.
100. Croix BS, Rak JW, Kapitain S, Sheehan C, Graham CH, Kerbel RS. Reversal by hyaluronidase of adhesion-dependent multicellular drug resistance in mammary carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(18):1285-96.
101. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36(2-3):193-207.
102. Gallardo-Perez JC, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodriguez-Enriquez S, Aviles A, et al. NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids. *J Cell Biochem.* 2009;108(1):169-80.
103. Zamora PO, Danielson KG, Hosick HL. Invasion of endothelial cell monolayers on collagen gels by cells from mammary tumor spheroids. *Cancer Res.* 1980;40(12):4631-9.
104. Pacheco-Marin R, Melendez-Zajgla J, Castillo-Rojas G, Mandujano-Tinoco E, Garcia-Venzor A, Uribe-Carvajal S, et al. Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids. *Sci Rep.* 2016;6:23373.
105. Gallardo-Perez JC, Rivero-Segura NA, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S. GPI/AMF inhibition blocks the development of the metastatic phenotype of mature multi-cellular tumor spheroids. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(6):1043-53.
106. Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Hernandez-Resendiz I, Del Mazo-Monsalvo I, Robledo-Cadena DX, Moreno-Sanchez R, et al. Hypoglycemia Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness, and Restrains the Warburg Phenotype, in Hypoxic HeLa Cell Cultures and Microspheroids. *J Cell Physiol.* 2017;232(6):1346-59.

107. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(3):768-72.
108. Lee C, Siu A, Ramos DM. Multicellular Spheroids as a Model for Hypoxia-induced EMT. *Anticancer Res*. 2016;36(12):6259-63.
109. Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *Int J Cancer*. 2009;124(9):2060-70.
110. McMahan KM, Volpato M, Chi HY, Musiwaro P, Poterlowicz K, Peng Y, et al. Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *J Proteome Res*. 2012;11(5):2863-75.
111. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al. Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *Oncotarget*. 2016;7(22):33297-305.
112. Rodriguez-Enriquez S, Gallardo-Perez JC, Aviles-Salas A, Marin-Hernandez A, Carreno-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, et al. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol*. 2008;216(1):189-97.
113. Smith H, Board M, Pellagatti A, Turley H, Boultonwood J, Callaghan R. The Effects of Severe Hypoxia on Glycolytic Flux and Enzyme Activity in a Model of Solid Tumors. *J Cell Biochem*. 2016;117(8):1890-901.
114. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9339-44.
115. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):48-53.
116. Vazquez-Santillan K, Melendez-Zajgla J, Jimenez-Hernandez LE, Gaytan-Cervantes J, Munoz-Galindo L, Pina-Sanchez P, et al. NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci Rep*. 2016;6:37340.
117. Robertson FM, Ogasawara MA, Ye Z, Chu K, Pickei R, Debeb BG, et al. Imaging and analysis of 3D tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype. *J Biomol Screen*. 2010;15(7):820-9.
118. Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri AS. Spheroid-Formation (Colonsphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev*. 2016;12(4):492-9.
119. Liu J, Ma L, Xu J, Liu C, Zhang J, Liu J, et al. Co-expression of CD44 and ABCG2 in spheroid body-forming cells of gastric cancer cell line MKN45. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(125):975-80.
120. Leng Z, Tao K, Xia Q, Tan J, Yue Z, Chen J, et al. Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56082.
121. Fan X, Ouyang N, Teng H, Yao H. Isolation and characterization of spheroid cells from the HT29 colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(10):1279-85.
122. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zacchetti A, et al. Tumor initiating cells: development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle*. 2010;9(6):1194-206.
123. Fang DD, Kim YJ, Lee CN, Aggarwal S, McKinnon K, Mesmer D, et al. Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery. *Br J Cancer*. 2010;102(8):1265-75.
124. Reynolds DS, Tevis KM, Blessing WA, Colson YL, Zaman MH, Grinstaff MW. Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. *Sci Rep*. 2017;7(1):10382.



125. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep.* 2015;35(3).
126. Boghaert ER, Lu X, Hessler PE, McGonigal TP, Oleksijew A, Mitten MJ, et al. The Volume of Three-Dimensional Cultures of Cancer Cells In Vitro Influences Transcriptional Profile Differences and Similarities with Monolayer Cultures and Xenografted Tumors. *Neoplasia.* 2017;19(9):695-706.
127. Paullin T, Powell C, Menzie C, Hill R, Cheng F, Martyniuk CJ, et al. Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182930.
128. Yue X, Lukowski JK, Weaver EM, Skube SB, Hummon AB. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of 2D and 3D Colon Cancer Cell Culture Models. *J Proteome Res.* 2016;15(12):4265-76.
129. Morrison BJ, Hastie ML, Grewal YS, Bruce ZC, Schmidt C, Reynolds BA, et al. Proteomic comparison of mcf-7 tumoursphere and monolayer cultures. *PLoS One.* 2012;7(12):e52692.
130. Gaedtke L, Thoenes L, Culmsee C, Mayer B, Wagner E. Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells. *J Proteome Res.* 2007;6(11):4111-8.
131. Wright MW, Bruford EA. Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. *Hum Genomics.* 2011;5(2):90-8.
132. Boo L, Ho WY, Ali NM, Yeap SK, Ky H, Chan KG, et al. MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line. *Int J Biol Sci.* 2016;12(4):427-45.
133. Munoz-Galindo L, Melendez-Zajgla J, Pacheco-Fernandez T, Rodriguez-Sosa M, Mandujano-Tinoco EA, Vazquez-Santillan K, et al. Changes in the transcriptome profile of breast cancer cells grown as spheroids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;516(4):1258-64.
134. Cobb M. Who discovered messenger RNA? *Curr Biol.* 2015;25(13):R526-32.
135. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1008:1-46.
136. Inouye M, Delihans N. Small RNAs in the prokaryotes: a growing list of diverse roles. *Cell.* 1988;53(1):5-7.
137. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature.* 1991;351(6322):153-5.
138. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* 1990;10(1):28-36.
139. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190:372-3.
140. Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;351(6324):325-9.
141. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;349(6304):38-44.
142. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
143. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11995-9.
144. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931-45.
145. Kapranov P, Cawley SE, Drenkow J, Bekiranov S, Strausberg RL, Fodor SP, et al. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science.* 2002;296(5569):916-9.

146. Bono H, Kasukawa T, Furuno M, Hayashizaki Y, Okazaki Y. FANTOM DB: database of Functional Annotation of RIKEN Mouse cDNA Clones. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):116-8.
147. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science.* 2005;309(5740):1559-63.
148. Mattick JS. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays.* 2003;25(10):930-9.
149. The EPC, Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57.
150. Fang S, Zhang L, Guo J, Niu Y, Wu Y, Li H, et al. NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D308-D14.
151. Housman G, Ulitsky I. Methods for distinguishing between protein-coding and long noncoding RNAs and the elusive biological purpose of translation of long noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(1):31-40.
152. Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, Winders BR, Troupes CD, Wu F, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science.* 2016;351(6270):271-5.
153. Massone S, Ciarlo E, Vella S, Nizzari M, Florio T, Russo C, et al. NDM29, a RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid beta secretion. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(7):1170-7.
154. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(1):169-76.
155. Yang L, Duff MO, Graveley BR, Carmichael GG, Chen LL. Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biol.* 2011;12(2):R16.
156. Wilusz JE, JnBaptiste CK, Lu LY, Kuhn CD, Joshua-Tor L, Sharp PA. A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev.* 2012;26(21):2392-407.
157. Schlackow M, Nojima T, Gomes T, Dhir A, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs. *Mol Cell.* 2017;65(1):25-38.
158. Marques AC, Hughes J, Graham B, Kowalczyk MS, Higgs DR, Ponting CP. Chromatin signatures at transcriptional start sites separate two equally populated yet distinct classes of intergenic long noncoding RNAs. *Genome Biol.* 2013;14(11):R131.
159. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012;22(9):1775-89.
160. Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, Fox AH, Fortini E, Moscato P, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res.* 2012;22(5):885-98.
161. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489(7414):101-8.
162. Ward M, McEwan C, Mills JD, Janitz M. Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *J Hum Transcr.* 2015;1(1):2-9.
163. Li F, Xiao Y, Huang F, Deng W, Zhao H, Shi X, et al. Spatiotemporal-specific lncRNAs in the brain, colon, liver and lung of macaque during development. *Mol Biosyst.* 2015;11(12):3253-63.
164. Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C, et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016;17:14.
165. Lu Z, Chang HY. Decoding the RNA structurome. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;36:142-8.
166. Johnsson P, Lipovich L, Grander D, Morris KV. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(3):1063-71.

167. Somarowthu S, Legiewicz M, Chillon I, Marcia M, Liu F, Pyle AM. HOTAIR forms an intricate and modular secondary structure. *Mol Cell*. 2015;58(2):353-61.
168. Beniaminov A, Westhof E, Krol A. Distinctive structures between chimpanzee and human in a brain noncoding RNA. *RNA*. 2008;14(7):1270-5.
169. Magistri M, Faghihi MA, St Laurent G, 3rd, Wahlestedt C. Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts. *Trends Genet*. 2012;28(8):389-96.
170. Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*. 2008;451(7175):202-6.
171. Kapranov P, Drenkow J, Cheng J, Long J, Helt G, Dike S, et al. Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res*. 2005;15(7):987-97.
172. Xu Z, Wei W, Gagneur J, Perocchi F, Clauder-Munster S, Camblong J, et al. Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature*. 2009;457(7232):1033-7.
173. Wei W, Pelechano V, Jarvelin AI, Steinmetz LM. Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends Genet*. 2011;27(7):267-76.
174. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2013;51(6):792-806.
175. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, Lopes A, Fachel AA, Moreira YB, et al. Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol*. 2007;8(3):R43.
176. Louro R, El-Jundi T, Nakaya HI, Reis EM, Verjovski-Almeida S. Conserved tissue expression signatures of intronic noncoding RNAs transcribed from human and mouse loci. *Genomics*. 2008;92(1):18-25.
177. Shahryari A, Jazi MS, Samaei NM, Mowla SJ. Long non-coding RNA SOX2OT: expression signature, splicing patterns, and emerging roles in pluripotency and tumorigenesis. *Front Genet*. 2015;6:196.
178. Milligan MJ, Lipovich L. Pseudogene-derived lncRNAs: emerging regulators of gene expression. *Front Genet*. 2014;5:476.
179. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, et al. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*. 2004;304(5675):1321-5.
180. Mestdagh P, Fredlund E, Pattyn F, Rihani A, Van Maerken T, Vermeulen J, et al. An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours. *Oncogene*. 2010;29(24):3583-92.
181. Watters KM, Bryan K, Foley NH, Meehan M, Stallings RL. Expressional alterations in functional ultra-conserved non-coding RNAs in response to all-trans retinoic acid--induced differentiation in neuroblastoma cells. *BMC Cancer*. 2013;13:184.
182. Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol*. 2010;30(20):4808-17.
183. Balk B, Maicher A, Dees M, Klermund J, Luke-Glaser S, Bender K, et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(10):1199-205.
184. Wong LH, Brettingham-Moore KH, Chan L, Quach JM, Anderson MA, Northrop EL, et al. Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res*. 2007;17(8):1146-60.
185. Quenet D, Dalal Y. A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere. *Elife*. 2014;3:e03254.

186. Blower MD. Centromeric Transcription Regulates Aurora-B Localization and Activation. *Cell Rep.* 2016;15(8):1624-33.
187. Rosic S, Kohler F, Erhardt S. Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *J Cell Biol.* 2014;207(3):335-49.
188. Bierhoff H, Dammert MA, Brocks D, Dambacher S, Schotta G, Grummt I. Quiescence-induced lncRNAs trigger H4K20 trimethylation and transcriptional silencing. *Mol Cell.* 2014;54(4):675-82.
189. Li W, Notani D, Rosenfeld MG. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat Rev Genet.* 2016;17(4):207-23.
190. Kapranov P, Willingham AT, Gingeras TR. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat Rev Genet.* 2007;8(6):413-23.
191. Preker R, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, et al. RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science.* 2008;322(5909):1851-4.
192. Ntini E, Jarvelin AI, Bornholdt J, Chen Y, Boyd M, Jorgensen M, et al. Polyadenylation site-induced decay of upstream transcripts enforces promoter directionality. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(8):923-8.
193. Agarwal N, Ansari A. Enhancement of Transcription by a Splicing-Competent Intron Is Dependent on Promoter Directionality. *PLoS Genet.* 2016;12(5):e1006047.
194. Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science.* 2008;322(5908):1717-20.
195. Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature.* 2011;472(7341):120-4.
196. Yan P, Luo S, Lu JY, Shen X. Cis- and trans-acting lncRNAs in pluripotency and reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* 2017;46:170-8.
197. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007;129(7):1311-23.
198. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010;464(7291):1071-6.
199. Liu B, Sun L, Liu Q, Gong C, Yao Y, Lv X, et al. A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks I-kappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell.* 2015;27(3):370-81.
200. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2011;43(6):904-14.
201. Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, et al. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell.* 1993;73(1):61-71.
202. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet.* 2011;43(7):621-9.
203. Spitale RC, Tsai MC, Chang HY. RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics.* 2011;6(5):539-43.
204. Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL. MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* 2009;19(3):347-59.

205. Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(8):2525-30.
206. Yu S, Zhao Y, Lai F, Chu M, Hao Y, Feng Y, et al. LncRNA as ceRNAs may be involved in lactation process. *Oncotarget*. 2017;8(58):98014-28.
207. Fu Z, Li G, Li Z, Wang Y, Zhao Y, Zheng S, et al. Endogenous miRNA Sponge LincRNA-ROR promotes proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of pancreatic cancer cells. *Cell Death Discov*. 2017;3:17004.
208. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*. 2011;21(6):354-61.
209. Qureshi IA, Mattick JS, Mehler MF. Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Res*. 2010;1338:20-35.
210. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
211. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Expression of the steroid receptor RNA activator in human breast tumors. *Cancer Res*. 1999;59(17):4190-3.
212. Hube F, Guo J, Chooniedass-Kothari S, Cooper C, Hamedani MK, Dibrov AA, et al. Alternative splicing of the first intron of the steroid receptor RNA activator (SRA) participates in the generation of coding and noncoding RNA isoforms in breast cancer cell lines. *DNA Cell Biol*. 2006;25(7):418-28.
213. Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, Dhanasekaran SM, Cao Q, Brenner JC, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol*. 2011;29(8):742-9.
214. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2011;30(16):1956-62.
215. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. 2010;38(5):662-74.
216. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*. 2010;3(107):ra8.
217. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*. 2009;28(2):195-208.
218. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269(5228):1236-41.
219. Andersson S, Wallin KL, Hellstrom AC, Morrison LE, Hjerpe A, Auer G, et al. Frequent gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 in cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 2006;95(3):331-8.
220. Nowak T, Januszkiewicz D, Zawada M, Pernak M, Lewandowski K, Rembowska J, et al. Amplification of hTERT and hTERC genes in leukemic cells with high expression and activity of telomerase. *Oncol Rep*. 2006;16(2):301-5.
221. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell*. 2009;35(4):403-13.
222. Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(17):5797-806.

223. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003;22(39):8031-41.
224. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010;39(6):925-38.
225. Yang Z, Zhou L, Wu LM, Lai MC, Xie HY, Zhang F, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(5):1243-50.
226. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):789-91.
227. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14871-8.
228. Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, et al. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37982-96.
229. Fish JE, Matouk CC, Yeboah E, Bevan SC, Khan M, Patil K, et al. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15652-66.
230. Petrovics G, Zhang W, Makarem M, Street JP, Connelly R, Sun L, et al. Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients. *Oncogene*. 2004;23(2):605-11.
231. Li M, Li X, Zhuang Y, Flemington EK, Lin Z, Shan B. Induction of a novel isoform of the lncRNA HOTAIR in Claudin-low breast cancer cells attached to extracellular matrix. *Mol Oncol*. 2017;11(12):1698-710.
232. Zhuang Y, Wang X, Nguyen HT, Zhuo Y, Cui X, Fewell C, et al. Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen. *J Hematol Oncol*. 2013;6:35.
233. Zhao L, Ji G, Le X, Wang C, Xu L, Feng M, et al. Long Noncoding RNA LINC00092 Acts in Cancer-Associated Fibroblasts to Drive Glycolysis and Progression of Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(6):1369-82.
234. Zhang D, Ding L, Li Y, Ren J, Shi G, Wang Y, et al. Midkine derived from cancer-associated fibroblasts promotes cisplatin-resistance via up-regulation of the expression of lncRNA ANRIL in tumour cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):16231.
235. Ren Y, Jia HH, Xu YQ, Zhou X, Zhao XH, Wang YF, et al. Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF-ss1 secretion. *Mol Cancer*. 2018;17(1):5.
236. Vafae F, Colvin EK, Mok SC, Howell VM, Samimi G. Functional prediction of long non-coding RNAs in ovarian cancer-associated fibroblasts indicate a potential role in metastasis. *Sci Rep*. 2017;7(1):10374.
237. Teng C, Huang G, Luo Y, Pan Y, Wang H, Liao X, et al. Differential long noncoding RNAs expression in cancer-associated fibroblasts of non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics*. 2019;20(3):143-53.
238. Zeng XY, Xie H, Yuan J, Jiang XY, Yong JH, Zeng D, et al. M2-like tumor-associated macrophages-secreted EGF promotes epithelial ovarian cancer metastasis via activating EGFR-ERK signaling and suppressing lncRNA LIMT expression. *Cancer Biol Ther*. 2019:1-11.
239. Chen C, He W, Huang J, Wang B, Li H, Cai Q, et al. LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. *Nat Commun*. 2018;9(1):3826.

240. Huang JK, Ma L, Song WH, Lu BY, Huang YB, Dong HM, et al. LncRNA-MALAT1 Promotes Angiogenesis of Thyroid Cancer by Modulating Tumor-Associated Macrophage FGF2 Protein Secretion. *J Cell Biochem*. 2017;118(12):4821-30.
241. Zhou YX, Zhao W, Mao LW, Wang YL, Xia LQ, Cao M, et al. Long non-coding RNA NIFK-AS1 inhibits M2 polarization of macrophages in endometrial cancer through targeting miR-146a. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;104:25-33.
242. Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(2):106-13.
243. Jiang R, Tang J, Chen Y, Deng L, Ji J, Xie Y, et al. The long noncoding RNA Inc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion. *Nat Commun*. 2017;8:15129.
244. Wu K, Zhao Z, Liu K, Zhang J, Li G, Wang L. Long noncoding RNA Inc-sox5 modulates CRC tumorigenesis by unbalancing tumor microenvironment. *Cell Cycle*. 2017;16(13):1295-301.
245. Ji J, Yin Y, Ju H, Xu X, Liu W, Fu Q, et al. Long non-coding RNA Lnc-Tim3 exacerbates CD8 T cell exhaustion via binding to Tim-3 and inducing nuclear translocation of Bat3 in HCC. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):478.
246. Huang D, Chen J, Yang L, Ouyang Q, Li J, Lao L, et al. NKILA lncRNA promotes tumor immune evasion by sensitizing T cells to activation-induced cell death. *Nat Immunol*. 2018;19(10):1112-25.
247. Choudhry H, Mole DR. Hypoxic regulation of the noncoding genome and NEAT1. *Brief Funct Genomics*. 2016;15(3):174-85.
248. Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, Ayesh S, Abu-lail R, Hochberg A, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One*. 2007;2(9):e845.
249. Bertozzi D, Iurlaro R, Sordet O, Marinello J, Zaffaroni N, Capranico G. Characterization of novel antisense HIF-1 $\alpha$  transcripts in human cancers. *Cell Cycle*. 2011;10(18):3189-97.
250. Yang F, Huo XS, Yuan SX, Zhang L, Zhou WP, Wang F, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Mol Cell*. 2013;49(6):1083-96.
251. Takahashi K, Yan IK, Haga H, Patel T. Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 7):1585-94.
252. Lin A, Li C, Xing Z, Hu Q, Liang K, Han L, et al. The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 $\alpha$  signalling in triple-negative breast cancer. *Nat Cell Biol*. 2016;18(2):213-24.
253. Quinn JJ, Chang HY. In Situ Dissection of RNA Functional Subunits by Domain-Specific Chromatin Isolation by RNA Purification (dChIRP). In: Nakagawa S, Hirose T, editors. *Nuclear Bodies and Noncoding RNAs: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 199-213.
254. Kong L, Zhang Y, Ye ZQ, Liu XQ, Zhao SQ, Wei L, et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W345-9.
255. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D279-85.
256. Lin MF, Jungreis I, Kellis M. PhyloCSF: a comparative genomics method to distinguish protein coding and non-coding regions. *Bioinformatics*. 2011;27(13):i275-82.
257. Li JR, Sun CH, Li W, Chao RF, Huang CC, Zhou XJ, et al. Cancer RNA-Seq Nexus: a database of phenotype-specific transcriptome profiling in cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D944-51.
258. Walker W, Zhou ZQ, Ota S, Wynshaw-Boris A, Hurlin PJ. Mnt-Max to Myc-Max complex switching regulates cell cycle entry. *J Cell Biol*. 2005;169(3):405-13.
259. Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*. 2002;18(2):333-4.

260. Aquino-Galvez A, Gonzalez-Avila G, Delgado-Tello J, Castillejos-Lopez M, Mendoza-Milla C, Zuniga J, et al. Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1alpha and HIF-2alpha expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia. *Oncol Rep.* 2016;35(1):577-83.
261. Zhou D, Matchett GA, Jadhav V, Dach N, Zhang JH. The effect of 2-methoxyestradiol, a HIF-1 alpha inhibitor, in global cerebral ischemia in rats. *Neurol Res.* 2008;30(3):268-71.
262. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
263. Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, et al. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. *Sci Rep.* 2014;4:4012.
264. Andreu Z, Khan MA, Gonzalez-Gomez P, Negueruela S, Hortiguera R, San Emeterio J, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1 regulates radial stem cell quiescence and neurogenesis in the adult hippocampus. *Stem Cells.* 2015;33(1):219-29.
265. Oesterle EC, Chien WM, Campbell S, Nellimarla P, Fero ML. p27(Kip1) is required to maintain proliferative quiescence in the adult cochlea and pituitary. *Cell Cycle.* 2011;10(8):1237-48.
266. Georgia S, Bhushan A. p27 Regulates the transition of beta-cells from quiescence to proliferation. *Diabetes.* 2006;55(11):2950-6.
267. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. P27(KIP1) expression indicates that steroid receptor-positive cells are a non-proliferating, differentiated subpopulation of the normal human breast epithelium. *Eur J Cancer.* 2000;36 Suppl 4:S28-9.
268. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017;108(3):283-9.
269. Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, Szczylik C, Czarnecka AM. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2017;92(3):1505-20.
270. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 2016;163:94-108.
271. Schwarz-Cruz YCA, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Advances in the knowledge of breast cancer stem cells. A review. *Histol Histopathol.* 2016;31(6):601-12.
272. Jones BC, Kelley LC, Loskutov YV, Marinak KM, Kozyreva VK, Smolkin MB, et al. Dual Targeting of Mesenchymal and Amoeboid Motility Hinders Metastatic Behavior. *Mol Cancer Res.* 2017;15(6):670-82.
273. Gao Y, Wang Z, Hao Q, Li W, Xu Y, Zhang J, et al. Loss of ERalpha induces amoeboid-like migration of breast cancer cells by downregulating vinculin. *Nat Commun.* 2017;8:14483.
274. Aung A, Seo YN, Lu S, Wang Y, Jamora C, del Alamo JC, et al. 3D traction stresses activate protease-dependent invasion of cancer cells. *Biophys J.* 2014;107(11):2528-37.
275. Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol.* 2009;185(1):11-9.
276. Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Curr Biol.* 2017;27(3):392-400.
277. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2014;2(1):78-91.
278. McDonald PC, Chafe SC, Dedhar S. Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:27.



279. Leontieva OV, Natarajan V, Demidenko ZN, Burdelya LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(33):13314-8.
280. Mourtada-Maarabouni M, Hedge VL, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 7):939-46.
281. Renganathan A, Kresoja-Rakic J, Echeverry N, Ziltener G, Vrugt B, Opitz I, et al. GAS5 long non-coding RNA in malignant pleural mesothelioma. *Mol Cancer*. 2014;13:119.
282. Yang F, Zhang H, Mei Y, Wu M. Reciprocal regulation of HIF-1alpha and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect. *Mol Cell*. 2014;53(1):88-100.
283. Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jons T, Vieth M, Schlag PM, et al. HIF-1alpha determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;100(5):772-81.
284. Zhao H, Jiang H, Li Z, Zhuang Y, Liu Y, Zhou S, et al. 2-Methoxyestradiol enhances radiosensitivity in radioresistant melanoma MDA-MB-435R cells by regulating glycolysis via HIF-1alpha/PDK1 axis. *Int J Oncol*. 2017;50(5):1531-40.
285. Wu SL, Li YJ, Liao K, Shi L, Zhang N, Liu S, et al. 2-Methoxyestradiol inhibits the proliferation and migration and reduces the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 stem cells via NF-kappaB/HIF-1 signaling pathway inactivation and EMT reversal. *Oncol Rep*. 2017;37(2):793-802.
286. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 2000;165(2):1013-21.
287. Koong AC, Chen EY, Mivechi NF, Denko NC, Stambrook P, Giaccia AJ. Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res*. 1994;54(20):5273-9.
288. Beitner-Johnson D, Millhorn DE. Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem*. 1998;273(31):19834-9.
289. Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt K, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12091-6.
290. Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, Barbieux A, Raes M, et al. c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp Cell Res*. 2001;265(1):114-24.
291. Chen D, Li M, Luo J, Gu W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13595-8.
292. Ratajczak MZ. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a 'passkey' to cancerogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012;50(2):171-9.
293. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Kong R, Chen F, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol Carcinog*. 2015;54 Suppl 1:E1-E12.
294. An Z, Akily B, Sabalic M, Zong G, Chai Y, Sharpe PT. Regulation of Mesenchymal Stem to Transit-Amplifying Cell Transition in the Continuously Growing Mouse Incisor. *Cell Rep*. 2018;23(10):3102-11.
295. Gierut JJ, Lyons J, Shah MS, Genetti C, Breault DT, Haigis KM. Oncogenic K-Ras promotes proliferation in quiescent intestinal stem cells. *Stem Cell Res*. 2015;15(1):165-71.

296. Jensen KB, Watt FM. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: *Lrig1* is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32):11958-63.
297. von Eyss B, Jaenicke LA, Kortlever RM, Royle N, Wiese KE, Letschert S, et al. A MYC-Driven Change in Mitochondrial Dynamics Limits YAP/TAZ Function in Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2015;28(6):743-57.
298. Wang J, Liu X, Jiang Z, Li L, Cui Z, Gao Y, et al. A novel method to limit breast cancer stem cells in states of quiescence, proliferation or differentiation: Use of gel stress in combination with stem cell growth factors. *Oncol Lett*. 2016;12(2):1355-60.
299. Xiang L, Gilkes DM, Chaturvedi P, Luo W, Hu H, Takano N, et al. Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(2):151-64.
300. Shiraishi A, Tachi K, Essid N, Tsuboi I, Nagano M, Kato T, et al. Hypoxia promotes the phenotypic change of aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2017;108(3):362-72.
301. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer MC, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1740936.
302. A DACP, Marques O, Sampaio R, Rosa A, Garcia J, Rema A, et al. Characterization of CD44+ALDH1+Ki-67- Cells in Non-malignant and Neoplastic Lesions of the Breast. *Anticancer Res*. 2016;36(9):4629-38.
303. Dai J, Miller MA, Everetts NJ, Wang X, Li P, Li Y, et al. Elimination of quiescent slow-cycling cells via reducing quiescence depth by natural compounds purified from *Ganoderma lucidum*. *Oncotarget*. 2017;8(8):13770-81.
304. Quayle LA, Ottewell PD, Holen I. Chemotherapy resistance and stemness in mitotically quiescent human breast cancer cells identified by fluorescent dye retention. *Clin Exp Metastasis*. 2018;35(8):831-46.
305. Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, et al. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*. 2008;9:246.
306. Berkovits BD, Mayr C. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*. 2015;522(7556):363-7.
307. Kim J, Jiang J, Badawi M, Schmittgen TD. miR-221 regulates CD44 in hepatocellular carcinoma through the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(3):709-15.
308. Zeng JF, Ma XQ, Wang LP, Wang W. MicroRNA-145 exerts tumor-suppressive and chemoresistance lowering effects by targeting CD44 in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23(13):2337-45.
309. Leksa V, Schiller HB, Stockinger H. Biotin-Chasing Assay to Evaluate uPAR Stability and Cleavage on the Surface of Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1731:39-47.
310. Rubina KA, Sysoeva VY, Zagorujko EI, Tsokolaeva ZI, Kurdina MI, Parfyonova YV, et al. Increased expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in psoriatic skin and in basal cell carcinomas. *Arch Dermatol Res*. 2017;309(6):433-42.
311. Banyard J, Chung I, Migliozzi M, Phan DT, Wilson AM, Zetter BR, et al. Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:387.
312. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011;30(12):1436-48.

313. Mali AV, Joshi AA, Hegde MV, Kadam Sh S. Enterolactone Suppresses Proliferation, Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Through Inhibition of uPA Induced Plasmin Activation and MMPs-Mediated ECM Remodeling. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(4):905-15.
314. Huber MC, Mall R, Braselmann H, Feuchtinger A, Molatore S, Lindner K, et al. uPAR enhances malignant potential of triple-negative breast cancer by directly interacting with uPA and IGF1R. *BMC Cancer.* 2016;16:615.
315. Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res.* 2002;62(11):3289-97.
316. Nagaharu K, Zhang X, Yoshida T, Katoh D, Hanamura N, Kozuka Y, et al. Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2011;178(2):754-63.
317. Friedl P, Wolf K. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp.* 2003(70):277-85.
318. Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol.* 2011;21(12):736-44.
319. Talkenberger K, Cavalcanti-Adam EA, Voss-Bohme A, Deutsch A. Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments. *Sci Rep.* 2017;7(1):9237.
320. Bacon A, Harris A. Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Annals of Medicine.* 2004;36(7):530-9.
321. Hu X, Liu J, Zhao G, Zheng J, Qin X. Long non-coding RNA GAS5 aggravates hypoxia injury in PC-12 cells via down-regulating miR-124. *J Cell Biochem.* 2018;119(8):6765-74.
322. Geng X, Xu X, Fang Y, Zhao S, Hu J, Xu J, et al. Effect of long non-coding RNA growth arrest-specific 5 on apoptosis in renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrology (Carlton).* 2019;24(4):405-13.
323. Du J, Yang ST, Liu J, Zhang KX, Leng JY. Silence of LncRNA GAS5 Protects Cardiomyocytes H9c2 against Hypoxic Injury via Sponging miR-142-5p. *Mol Cells.* 2019;42(5):397-405.
324. Zhang B, Shimada Y, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Umemoto N, Nomoto T, et al. Zebrafish xenotransplantation model for cancer stem-like cell study and high-throughput screening of inhibitors. *Tumour Biol.* 2014;35(12):11861-9.
325. Moore JC, Langenau DM. Allograft Cancer Cell Transplantation in Zebrafish. *Adv Exp Med Biol.* 2016;916:265-87.
326. Eguiara A, Holgado O, Beloqui I, Abalde L, Sanchez Y, Callol C, et al. Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle.* 2011;10(21):3751-7.
327. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2011;28(3):745-52.
328. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol.* 2012;43(3):364-73.
329. Ma F, Li H, Wang H, Shi X, Fan Y, Ding X, et al. Enriched CD44(+)/CD24(-) population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Lett.* 2014;353(2):153-9.
330. Ameyar-Zazoua M, Souidi M, Fritsch L, Robin P, Thomas A, Hamiche A, et al. Physical and functional interaction between heterochromatin protein 1alpha and the RNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem.* 2009;284(41):27974-9.

331. Imasaki T, Shimizu T, Hashimoto H, Hidaka Y, Kose S, Imamoto N, et al. Structural basis for substrate recognition and dissociation by human transportin 1. *Mol Cell*. 2007;28(1):57-67.
332. Chaumet A, Castella S, Gasmi L, Fradin A, Clodic G, Bolbach G, et al. Proteomic analysis of interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) and nuclear factor 90 (NF90) interactome. *Biochimie*. 2013;95(6):1146-57.
333. Abdelhaleem M. RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin Biochem*. 2005;38(6):499-503.
334. Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(3):300-7.
335. Millan-Arino L, Islam AB, Izquierdo-Bouldstridge A, Mayor R, Terme JM, Luque N, et al. Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(7):4474-93.
336. Zhang L, Song D, Zhu B, Wang X. The role of nuclear matrix protein HNRNPU in maintaining the architecture of 3D genome. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;90:161-7.
337. Fan H, Lv P, Huo X, Wu J, Wang Q, Cheng L, et al. The nuclear matrix protein HNRNPU maintains 3D genome architecture globally in mouse hepatocytes. *Genome Res*. 2018;28(2):192-202.
338. Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Tsutui K, Nakagawa S. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev Cell*. 2010;19(3):469-76.
339. Hacısuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L, et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(2):198-206.
340. Lu Y, Liu X, Xie M, Liu M, Ye M, Li M, et al. The NF-kappaB-Responsive Long Noncoding RNA FIRRE Regulates Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Gene Expression through Interacting with hnRNP U. *J Immunol*. 2017;199(10):3571-82.
341. Mi L, Zhao XY, Li S, Yang G, Lin JD. Conserved function of the long noncoding RNA Blnc1 in brown adipocyte differentiation. *Mol Metab*. 2017;6(1):101-10.
342. Li S, Mi L, Yu L, Yu Q, Liu T, Wang GX, et al. Zbtb7b engages the long noncoding RNA Blnc1 to drive brown and beige fat development and thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(34):E7111-E20.
343. Chen J, Liu L, Wei G, Wu W, Luo H, Yuan J, et al. The long noncoding RNA ASNR regulates degradation of Bcl-2 mRNA through its interaction with AUF1. *Sci Rep*. 2016;6:32189.
344. Castellanos-Rubio A, Fernandez-Jimenez N, Kratchmarov R, Luo X, Bhagat G, Green PH, et al. A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*. 2016;352(6281):91-5.
345. Li J, He M, Xu W, Huang S. LINC01354 interacting with hnRNP-D contributes to the proliferation and metastasis in colorectal cancer through activating Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):161.
346. Huang PR, Hung SC, Wang TC. Telomeric DNA-binding activities of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(10):1164-74.
347. Fuller-Pace FV. The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(8):756-63.
348. Jung C, Mittler G, Oswald F, Borggreffe T. RNA helicase Ddx5 and the noncoding RNA SRA act as coactivators in the Notch signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(5):1180-9.
349. Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogryzko V, et al. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell*. 2006;11(4):547-60.

350. Wongtrakoongate P, Riddick G, Fucharoen S, Felsenfeld G. Association of the Long Non-coding RNA Steroid Receptor RNA Activator (SRA) with TrxG and PRC2 Complexes. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005615.
351. Akhade VS, Arun G, Donakonda S, Rao MR. Genome wide chromatin occupancy of mrhl RNA and its role in gene regulation in mouse spermatogonial cells. *RNA Biol.* 2014;11(10):1262-79.
352. Sallam T, Jones M, Thomas BJ, Wu X, Gilliland T, Qian K, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA. *Nat Med.* 2018;24(3):304-12.

Apéndice 1. Secuencias y nombres de los oligonucleótidos usados en esta tesis.

<b>Primer Name</b>	<b>Sequence</b>
<i>lncRNA-HAL Fw</i>	CTCGGACAGGGACAGTGTG
<i>lncRNA-HAL RV</i>	AAGCGGGAGGGTGAAGAAAA
<i>PLAU Fw</i>	GGGTCGCTCAAGGCTTAACT
<i>PLAU Rv</i>	ACGGATCTTCAGCAAGGCAA
<i>SCIN Fw</i>	TGGTTCTGGCAAAGTGGAGAT
<i>SCIN Rv</i>	GCTCATCTCGTGTGGCATT
<i>TNC Fw</i>	AGCAATCCAGCGACCATCAA
<i>TNC Rv</i>	GCCAACGGTGTCTTCCAGA
<i>ADM Fw</i>	CAGAAGAATCCGAGTGTTTGCC
<i>ADM Rv</i>	AATCAGTTTGTGGGCGAGCA
<i>LCN2</i>	AGTTCACGCTGGGCAACATT
<i>LCN2</i>	AGTTCTCCTTTAGTTCCGAAGTCA
<i>CD44 Fw</i>	ACCGACAGCACAGACAGAAT
<i>CD44 Rv</i>	TCCAGGTTTCTTGCCTCTT
<i>BMP5 Fw</i>	TCAAGGCGAGTGAGGTACTT
<i>BMP5 Rv</i>	TGGAGCACAACAAGGCTTTG
<i>ABCC13 Fw</i>	GTTTCAGGCACAGGAAGTACAG
<i>ABCC13 Rv</i>	TCCCTCAGATGTCCAATTGAA
<i>S100A7 Fw</i>	ACACACATCTCACTCATCCTTCT
<i>S100A7 Rv</i>	CAGGCTTGGCTTCTCAATCTT
<i>KLF12 Fw</i>	TCTCCCATCATCCCATCCCTTA
<i>KLF12 Rv</i>	TGCCTGAGTGCCCTTTCTTT
<i>ALDOC Fw</i>	CTGCCACTGAGGAGTTCATCAA
<i>ALDOC Rv</i>	CCATCTTCTCCACTGCCTTCAT
<i>MNT Fw</i>	TGTGTTAGGATGCGGCTTTC
<i>MNT Rv</i>	TTCCTCCCGCTACACTGAAA
<i>RP11-15G8 Fw</i>	Gacgttgccaccatgtcta
<i>RP11-15G8 Rv</i>	Actgtgccagcctgattt
<i>RP11-669N7 Fw</i>	TCATCTCCCAAGGTCTTCTTTCT
<i>RP11-669N7 Rv</i>	AGGCTTTATTGCTGGTGACATC
<i>CTC-260E6 Fw</i>	CTCCACTTGCTGTAACACCAAAG
<i>CTC-260E6 Rv</i>	CAATGTGCTGCTCCATAAAGATA

Apéndice 2. Secuencias y nombres de las sondas de ChIRP usadas en esta tesis.

<b>Probe Name</b>	<b>Sequence And Biotin modification</b>
<i>HAL-Probe-1</i>	CTCCACTTTGCTCCGTGCCA/3BioTEG/
<i>Hal-Probe-100</i>	TAGCTGGGACTCAGGTGCAA/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-200</i>	AGACGGAGGTCGCACTCTGT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-300</i>	TGTTCTTAGAGACGGAGGTC/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-400</i>	gtcttcaaaccttgaccac/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-500</i>	ACCCACATTGCTTCAATCTA/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-600</i>	agggagtgcacatgggtcaaa/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-700</i>	TGTGTGTGGCTTTTCACCTG/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-800</i>	TGACCTCAGGTGATCCACCT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-900</i>	CCACCAGGCAGGACTAATTT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1000</i>	CCCCTCTGTACCCAGGCT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1100</i>	agacagtaggaaactccctt/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1200</i>	gcagcttgacacttctgttg/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1300</i>	cagtttgctgttttagc/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1400</i>	GAAAATACTCCCTGTTGCCA/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1500</i>	TAATGCCTGATGATGGGAGA/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1600</i>	TCTGATCCTGTCACATCAGT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1700</i>	ggagaatcacagtaaccat/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1800</i>	aaggacctggaagagtgtg/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-1900</i>	ctgtccgagctgtgaatgaa/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2000</i>	ggcagtaaatacaggctga/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2100</i>	acagattggctcacactgag/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2200</i>	gcactgaggaaaaatggggc/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2300</i>	TGGTGTGGAGGAGGAACCAT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2400</i>	GTCCCCTTCTCCCTGTAT/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2500</i>	CGAAAGTGCTGGGATTACAG/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2600</i>	AGCGATTCTCCTGCCTCAGC/3BioTEG/
<i>HAL-Probe-2700</i>	TCCAACAGAGTTTCGCTCTT/3BioTEG/
<i>HPRT Probe 1</i>	GAT GTA CTG GCT GGA /3BioTEG/
<i>HPRT Probe 2</i>	GGA GTG AAG AGT GC/3BioTEG/

Apéndice 3. Tablas con los resultados del experimento de RNA-seq. Se muestran aquellos genes cuya expresión cambió tras el silenciamiento de lncRNA-HAL.

<i>ID</i>	<b>GENE SYMBOL</b>	<b>RealFC</b>	<b>C1Mean</b>	<b>C2Mean</b>
<i>ENSG00000181409.11_AATK</i>	AATK	0.4871674	104.910152	215.35776
<i>ENSG00000243064.8_ABCC13</i>	ABCC13	0.1573452	3.44816307	21.968192
<i>ENSG00000160179.18_ABCG1</i>	ABCG1	0.59394426	101.550133	170.9827
<i>ENSG00000278540.4_ACACA</i>	ACACA	0.90258101	1689.48311	1871.83651
<i>ENSG00000134575.9_ACP2</i>	ACP2	0.74286678	260.6694	350.900022
<i>ENSG00000173175.14_ADCY5</i>	ADCY5	0.40501466	32.2634929	79.6747516
<i>ENSG00000148926.9_ADM</i>	ADM	2.90875322	118.459445	40.7185994
<i>ENSG00000185567.6_AHNAK2</i>	AHNAK2	0.59938722	1114.63071	1859.62376
<i>ENSG00000109107.13_ALDOC</i>	ALDOC	0.39704237	111.871121	281.776352
<i>ENSG00000012779.10_ALOX5</i>	ALOX5	1.89845717	60.0880779	31.6462727
<i>ENSG00000089053.12_ANAPC5</i>	ANAPC5	1.26570412	4117.51201	3253.13735
<i>ENSG00000138381.9_ASNSD1</i>	ASNSD1	1.28604582	1150.472	894.578648
<i>ENSG00000130707.17_ASS1</i>	ASS1	0.7117209	5407.03024	7597.12568
<i>ENSG00000185344.13_ATP6V0A2</i>	ATP6V0A2	1.36602151	1123.46019	822.429609
<i>ENSG00000112175.7_BMP5</i>	BMP5	0.10741785	6.47985074	60.4068734
<i>ENSG00000169925.16_BRD3</i>	BRD3	0.67281109	482.752614	717.520708
<i>ENSG00000222047.8_C10orf55</i>	C10orf55	5.12111077	13.4657454	2.62141064
<i>ENSG00000130921.7_C12orf65</i>	C12orf65	1.37182826	348.412929	253.974365
<i>ENSG00000166780.10_C16orf45</i>	C16orf45	0.44574955	16.8846996	37.8917764
<i>ENSG00000171159.4_C9orf16</i>	C9orf16	0.77495741	760.544009	981.403947
<i>ENSG00000138172.10_CALHM2</i>	CALHM2	0.74586442	407.388669	546.200082
<i>ENSG00000215126.10_CBWD7</i>	CBWD7	1.4561527	376.25693	258.387989
<i>ENSG00000141582.14_CBX4</i>	CBX4	0.81318377	1440.22829	1771.10047
<i>ENSG00000152492.13_CCDC50</i>	CCDC50	1.14607294	954.450862	832.799872
<i>ENSG00000177697.17_CD151</i>	CD151	0.83790282	1454.73327	1736.16183
<i>ENSG0000026508.16_CD44</i>	CD44	1.60374622	367.7447	229.299784
<i>ENSG00000113240.12_CLK4</i>	CLK4	0.76318524	249.00351	326.271872
<i>ENSG00000106789.12_CORO2A</i>	CORO2A	0.58123434	153.519627	264.134109
<i>ENSG00000182809.10_CRIP2</i>	CRIP2	0.64638241	1249.48546	1933.0492
<i>ENSG00000164796.17_CSMD3</i>	CSMD3	0.05815388	5.5065426	94.8511332
<i>ENSG00000267383.6 CTC-260E6.6</i>	CTC-260E6.6	0.08021325	4.02657579	50.3130523
<i>ENSG00000159348.12_CYB5R1</i>	CYB5R1	1.26504676	464.747235	367.373445
<i>ENSG00000138061.11_CYP1B1</i>	CYP1B1	2.03521412	4542.21138	2231.80499
<i>ENSG00000135905.18_DOCK10</i>	DOCK10	0.52948136	78.5460784	148.354201
<i>ENSG00000175920.15_DOK7</i>	DOK7	0.42106632	203.141504	482.459135



ENSG00000114346.13\_ECT2  
 ENSG00000179388.8\_EGR3  
 ENSG00000111674.8\_ENO2  
 ENSG00000149485.16\_FADS1  
 ENSG00000134824.13\_FADS2  
 ENSG00000113194.12\_FAF2  
 ENSG00000158169.11\_FANCC  
 ENSG00000083857.13\_FAT1  
 ENSG00000066926.10\_FECH  
 ENSG00000137312.14\_FLOT1  
 ENSG00000089597.16\_GANAB  
 ENSG00000167741.10\_GGT6  
 ENSG00000167110.16\_GOLGA2  
 ENSG00000174428.16\_GTF2IRD2B  
 ENSG00000152402.10\_GUCY1A2  
 ENSG00000127946.16\_HIP1  
 ENSG00000274290.2\_HIST1H2BE  
 ENSG00000278272.1\_HIST1H3C  
 ENSG00000072571.19\_HMMR  
 ENSG00000166033.11\_HTRA1  
 ENSG00000162729.13\_IGSF8  
 ENSG00000043143.20\_JADE2  
 ENSG00000008083.13\_JARID2  
 ENSG00000124249.6\_KCNK15  
 ENSG00000235750.9\_KIAA0040  
 ENSG00000164976.8\_KIAA1161  
 ENSG00000137177.18\_KIF13A  
 ENSG00000118922.16\_KLF12  
 ENSG00000148346.11\_LCN2  
 ENSG00000050405.13\_LIMA1  
 ENSG00000204054.12\_LINC00963  
 ENSG00000165379.13\_LRFN5  
 ENSG00000185022.11\_MAFF  
 ENSG00000155254.12\_MARVELD1  
 ENSG00000147316.12\_MCPH1  
 ENSG00000169519.20\_METTL15  
 ENSG00000147324.10\_MFHAS1  
 ENSG00000122140.10\_MRPS2  
 ENSG00000179820.15\_MYADM

ECT2	0.86848751	2979.52625	3430.7086
EGR3	0.50483959	696.370524	1379.39951
ENO2	0.60903478	101.627476	166.872878
FADS1	0.74096045	1417.85478	1913.53989
FADS2	0.7330146	263.418647	359.36708
FAF2	0.84207742	1821.13613	2162.67253
FANCC	0.77637841	339.571314	437.381493
FAT1	1.33831469	1438.18836	1074.62392
FECH	1.2771789	1972.00678	1544.03115
FLOT1	0.79293394	571.679663	720.970186
GANAB	0.87784687	5329.10864	6070.65999
GGT6	0.69460666	123.95715	178.461007
GOLGA2	0.78456959	1508.93771	1923.2709
GTF2IRD2B	1.33031028	327.511648	246.189442
GUCY1A2	0.19638302	56.1938321	286.184974
HIP1	0.73944644	682.048699	922.380946
HIST1H2BE	0.86634855	2072.6827	2392.43665
HIST1H3C	0.7698528	1264.63458	1642.6996
HMMR	0.76500656	970.038365	1268.01621
HTRA1	1.39751358	457.037414	327.033272
IGSF8	0.64887118	97.3368888	150.014986
JADE2	0.78393134	1127.36407	1438.09307
JARID2	0.77596048	857.852262	1105.53892
KCNK15	1.52040822	605.181362	398.035309
KIAA0040	0.73786841	513.97479	696.570559
KIAA1161	0.77220294	362.924351	469.988665
KIF13A	1.2893646	1012.41577	785.20294
KLF12	0.38026431	48.7405547	128.191764
LCN2	2.53337343	527.71787	208.300335
LIMA1	1.28877231	1054.60852	818.302523
LINC00963	0.70966045	405.566694	571.498101
LRFN5	0.03150821	0.77586043	24.93145
MAFF	0.61504736	65.8513169	107.073326
MARVELD1	1.18016317	1013.52816	858.801889
MCPH1	1.39966789	484.068226	345.842205
METTL15	0.64526724	230.2598	356.849583
MFHAS1	1.44830616	773.327207	533.94976
MRPS2	0.8196395	1388.76899	1694.36781
MYADM	0.69449463	584.346416	841.402438

<i>ENSG00000119408.16_NEK6</i>	NEK6	0.80853866	439.860906	544.022001
<i>ENSG00000166881.9_NEMP1</i>	NEMP1	0.81836595	1172.54008	1432.78432
<i>ENSG00000103226.17_NOMO3</i>	NOMO3	1.18760082	1732.84841	1459.1153
<i>ENSG00000172818.9_OVOL1</i>	OVOL1	0.74724374	356.863134	477.575979
<i>ENSG00000129116.17_PALLD</i>	PALLD	1.5660706	295.499734	188.685027
<i>ENSG00000173599.13_PC</i>	PC	0.73627788	383.688947	521.123333
<i>ENSG00000197724.10_PHF2</i>	PHF2	0.77465812	767.798135	991.147412
<i>ENSG00000150867.13_PIP4K2A</i>	PIP4K2A	1.33736153	967.011169	723.071342
<i>ENSG00000122861.15_PLAU</i>	PLAU	4.98952241	45.6199133	9.13514649
<i>ENSG00000008323.15_PLEKHG6</i>	PLEKHG6	0.60223405	71.9035779	119.401344
<i>ENSG00000176903.4_PNMA1</i>	PNMA1	1.28105097	1287.42865	1004.97628
<i>ENSG00000143847.15_PPFIA4</i>	PPFIA4	0.5356128	195.934004	365.821447
<i>ENSG00000170836.11_PPM1D</i>	PPM1D	1.25669647	4621.70181	3677.65753
<i>ENSG00000204569.9_PPP1R10</i>	PPP1R10	0.82624765	1541.07569	1865.15196
<i>ENSG00000117360.12_PRPF3</i>	PRPF3	0.82032808	2212.52622	2697.12577
<i>ENSG00000052344.15_PRSS8</i>	PRSS8	0.79647604	653.113383	820.006362
<i>ENSG00000169403.11_PTAFR</i>	PTAFR	0.49423018	45.9088715	92.8998903
<i>ENSG00000185920.15_PTCH1</i>	PTCH1	0.53596037	77.9906707	145.5244
<i>ENSG00000081237.18_PTPRC</i>	PTPRC	0.00982032	0.28253816	29.77907
<i>ENSG00000206418.3_RAB12</i>	RAB12	1.26420849	1667.42145	1318.9429
<i>ENSG00000129667.12_RHBDF2</i>	RHBDF2	1.47297545	696.93867	473.147018
<i>ENSG00000173456.4_RNF26</i>	RNF26	0.79441878	357.500461	450.017707
<i>ENSG00000205625.2_RP11-15G8.1</i>	RP11-15G8.1	18.4277969	14.6663248	0.78642319
<i>ENSG00000249196.6_RP11-669N7.2</i>	RP11-669N7.2	0.4271534	14.5622111	34.1047022
<i>ENSG00000185088.13_RPS27L</i>	RPS27L	1.66595936	1473.00198	884.172417
<i>ENSG00000048392.11_RRM2B</i>	RRM2B	1.23424341	1658.85244	1344.02184
<i>ENSG00000114993.15_RTKN</i>	RTKN	0.80887014	712.266911	880.572522
<i>ENSG00000189171.14_S100A13</i>	S100A13	0.74993696	538.898639	718.595251
<i>ENSG00000143556.8_S100A7</i>	S100A7	0.17180728	19.8464568	115.564011
<i>ENSG00000006747.14_SCIN</i>	SCIN	4.18078485	79.1596505	18.9265522
<i>ENSG00000121064.12_SCPEP1</i>	SCPEP1	1.3981857	499.69272	357.383671
<i>ENSG00000143416.20_SELENBP1</i>	SELENBP1	0.70957503	913.117499	1286.85531
<i>ENSG00000184702.17_SEPT5</i>	SEPT5	0.68493375	113.203487	165.28115
<i>ENSG00000167565.12_SERTAD3</i>	SERTAD3	0.72727226	425.779393	585.450792
<i>ENSG00000107819.13_SFXN3</i>	SFXN3	0.60632806	784.883292	1294.49268
<i>ENSG00000127990.15_SGCE</i>	SGCE	0.10323218	3.54149712	34.3930053
<i>ENSG00000104205.12_SGK3</i>	SGK3	1.32061184	1333.70832	1009.91455
<i>ENSG00000198964.13_SGMS1</i>	SGMS1	1.20208163	984.582363	819.062796
<i>ENSG00000125089.16_SH3TC1</i>	SH3TC1	0.57933813	113.087573	195.20859

ENSG00000110660.14\_SLC35F2  
 ENSG00000139508.14\_SLC46A3  
 ENSG00000151012.13\_SLC7A11  
 ENSG00000187678.8\_SPRY4  
 ENSG00000124193.14\_SRSF6  
 ENSG00000196182.10\_STK40  
 ENSG00000141556.20\_TBCD  
 ENSG00000196781.13\_TLE1  
 ENSG00000041982.15\_TNC  
 ENSG00000181634.7\_TNFSF15  
 ENSG00000155313.15\_USP25  
 ENSG00000111962.7\_UST  
 ENSG00000154767.14\_XPC  
 ENSG00000171448.8\_ZBTB26  
 ENSG00000160445.10\_ZER1  
 ENSG00000081386.12\_ZNF510  
 ENSG00000198131.13\_ZNF544  
 ENSG00000132003.9\_ZSWIM4

SLC35F2	1.15706903	1092.44117	944.143847
SLC46A3	1.32080049	347.721447	263.263258
SLC7A11	1.58922754	1012.82608	637.303443
SPRY4	0.43179501	92.0919399	213.290149
SRSF6	1.09994697	4046.04369	3678.39796
STK40	0.82491062	649.058645	786.825114
TBCD	0.7989044	1262.23399	1579.95876
TLE1	0.74115633	732.479151	988.29587
TNC	3.48046778	20.7118857	5.94376455
TNFSF15	3.00495745	79.8558643	26.568035
USP25	1.19265123	760.782137	637.889933
UST	1.28097825	522.639231	407.997889
XPC	1.26905608	2030.24257	1599.80312
ZBTB26	0.68302786	164.198156	240.40209
ZER1	0.7685277	842.950821	1096.84158
ZNF510	0.7167097	267.758297	373.597747
ZNF544	1.20613347	912.942097	756.914601
ZSWIM4	0.47727561	66.2716556	138.865012
	RealFC	C1Mean	C2Mean

## Apéndice 4. Artículo



## Microenvironment-regulated lncRNA-HAL is able to promote stemness in breast cancer cells

Alfredo García-Venzor<sup>a</sup>, Edna Ayerim Mandujano-Tinoco<sup>a,c</sup>, Floria Lizarraga<sup>a</sup>, Cecilia Zampedri<sup>a</sup>, Edgar Krötzsch<sup>c</sup>, Rosa María Salgado<sup>c</sup>, Víctor Manuel Dávila-Borja<sup>d</sup>, Sergio Encarnación-Guevara<sup>e</sup>, Jorge Melendez-Zajgla<sup>b</sup>, Vilma Maldonado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Epigenetics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur No.4809, Col Arenal Tepepan, Talpan, Mexico City 14610, Mexico

<sup>b</sup> Functional Genomics Laboratories, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur No.4809, Col Arenal Tepepan, Talpan, Mexico City 14610, Mexico

<sup>c</sup> Laboratory of Connective Tissue, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra", Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

<sup>e</sup> Programa de Genómica Funcional de Procariontes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hypoxia  
lncRNAs  
Migration  
Tumor microenvironment  
Stem cells  
Spheroids  
MCTS

### ABSTRACT

Multicellular Tumor Spheroids culture (MCTS) is an *in vitro* model mimicking the characteristics of the tumor microenvironment, such as hypoxia and acidosis, resulting in the presence of both proliferating and quiescent cell populations. lncRNA's is a novel group of regulatory molecules that participates in the acquisition of tumorigenic phenotypes. In the present work we evaluated the oncogenic association of an uncharacterized lncRNA (lncRNA-HAL) in the tumorigenic phenotype induced by the MCTS microenvironment. We measured lncRNA-HAL expression level in MCF-7-MCTS populations and under different hypoxic conditions by RT-qPCR. Afterwards, we silenced lncRNA-HAL expression by shRNAs and evaluated its effect in MCF-7 transcriptome (by RNAseq) and validated the modified cellular processes by proliferation, migration, and stem cells assays. Finally, we analyzed which proteins interacts with lncRNA-HAL by ChIRP assay, to propose a possible molecular mechanism for this lncRNA.

We found that lncRNA-HAL is overexpressed in the internal quiescent populations (p27 positive populations) of MCF-7-MCTS, mainly in the quiescent stem cell population, being hypoxia one of the microenvironmental cues responsible of its overexpression. Transcriptome analysis of lncRNA-HAL *knockdown* MCF7 cells revealed that lncRNA-HAL effect is associated with proliferation, migration and cell survival mechanisms; moreover, lncRNA-HAL silencing increased cell proliferation and impaired cancer stem cell proportion and function, resulting in decreased tumor grafting *in vivo*. In addition, we found that this lncRNA was overexpressed in triple-negative breast cancer patients. Analysis by ChIRP assay showed that this nuclear lncRNA binds to histones and hnRNPs suggesting a participation at the chromatin level and transcriptional regulation. The results obtained in the present work suggest that the function of lncRNA-HAL is associated with quiescent stem cell populations, which in turn is relevant due to its implications in cancer cell survival and resistance against treatment *in vivo*. Altogether, our data highlights a new lncRNA whose expression is regulated by the tumor microenvironment and associated to stemness in breast cancer.

### 1. Introduction

Breast cancer is a major public health problem worldwide and the main cause of cancer related deaths in women (15%) [1]. A key process in cancer progression, involving tumor initiation and progression, is the acquisition of a tumor microenvironment [2] composed by tumor and non-tumor cells, the extracellular matrix, and the chemical

environment (pH, oxygen concentration, and metabolites) [3]. The model of multicellular tumor spheroids (MCTS) resembles several aspects of an *in vivo* tumor microenvironment since MCTS growth can reach a diameter of  $\geq 300\mu\text{m}$  and develop several traits common to the tumor microenvironment, such as hypoxia, acidosis and nutrient gradient [4]. MCTS also develop a high degree of cellular heterogeneity characterized by an external population of proliferating cells, an

\* Corresponding author at: National Institute of Genomic Medicine, CDMX, Mexico.

E-mail address: [vmaldonado@inmegen.gob.mx](mailto:vmaldonado@inmegen.gob.mx) (V. Maldonado).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118523>

Received 26 February 2019; Received in revised form 12 July 2019; Accepted 1 August 2019

Available online 08 August 2019

0167-4889/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

intermediate population of quiescent cells and an internal population of cells undergoing apoptosis and necrosis. Due to these characteristics, MCTS constitutes a suitable model in the analysis of the microenvironmental cues affecting the acquisition of aggressive traits such as enhanced migration, invasion, resistance to stress conditions, and stem cell phenotype [5].

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are transcripts ( $\geq 200$  nucleotides in length) lacking protein coding potential. lncRNAs are mainly transcribed by RNA polymerase II and, like mRNAs, are subjected to 5' capping, 3' polyadenylation, and alternative splicing [6]. These RNAs have been shown to play a pivotal role in every regulation step of gene expression, including the modulation of chromatin architecture, transcriptional and post-transcriptional regulation, and RNA processing [7].

The role of several lncRNAs has been recently explored in cancer, showing that these molecules are important regulators of the tumorigenic phenotype since they participate in the acquisition of cancer hallmark characteristics [8]. It has also been demonstrated that some lncRNAs are part of the molecular mechanisms responsible for the phenotypic cell behavior elicited by microenvironmental stimuli. For example, Choudhry et al. (2014) observed that several lncRNAs are upregulated under hypoxia in MCF7 cells, suggesting that the cellular response to the tumor microenvironment is regulated by complex molecular networks [9]. Similar results have been found for individual microenvironmental stimulus, such as hypoxia [10], acidotic activation of Akt [11], interaction with tumor derived Col1 ECM component [12], and the modulation of immune cells by tumor cells [13]. Interestingly, it has been shown that lncRNAs can also regulate additional key cancer processes such as stemness. Wang Sun et al. reported that lncRNA-DILC participates in the acquisition of a stem cell phenotype in hepatocellular carcinoma-derived spheroids [14]. Nevertheless, there are few reports demonstrating a stem-regulating role for lncRNA in breast cancer tumors [15].

We previously reported that several lncRNAs were regulated in breast cancer-derived MCTS, suggesting an important role of these molecules in MCTS phenotype [16]. Since there is paucity on the role of lncRNAs in microenvironment regulation and on the functional implication of these lncRNAs in breast cells tumorigenic phenotype, we sought to evaluate the role of the MCTS-associated lncRNA-HAL in the aggressiveness traits of breast cancer cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and transfection

MCF7 cells were cultured using RPMI 1640 (Cellgro, no. cat. 10-040, MA, USA) with 5% FBS in standard culture conditions. MDA-MB-231 cells were cultured using DMEM (Cellgro, no. cat. 10-013, MA, USA) with 10% FBS in standard culture conditions. The growth curves of MCF7 cells in 2D (monolayer) were performed by seeding  $5 \times 10^4$  cells in 35 mm petri dishes followed by cell counting every day.

For MCTS cultures,  $2 \times 10^6$  MCF7 cells were seeded as suspension cultures on T-12.5 flasks with Leibovitz's L-15 media (Cellgro no. cat. 10-045-CV, MA, USA) and incubated with 60 rpm orbital agitation at 37 °C. Every two days media was changed, and the amorphous aggregates were removed. MCTS growth curve were done by retrieving 30 spheroids every day and measuring their diameters by means of an inverted Microscope Axio Scope A1 and AxioVision software version 4.8.2.0 software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### 2.2. lncRNA-HAL silencing

Two shRNAs for lncRNA-HAL were designed using the e-RNAi algorithm [17]. The selected sequences are shown in Supplementary Table 1. The oligonucleotides were then aligned in a thermal cycler (95 °C for 30 seg, 72 °C for 2 min, 37 °C for 2 min and 25 °C for 2 min). The aligned oligonucleotides were cloned in pSIREN-RetroQ vector

(Clontech, CA, USA) previously digested with BamHI and EcoRI. Plasmid transfection was done using X-Fect transfection reagent (Cat. 631,317 Clontech laboratories, CA, USA) as indicated by the manufacturer. Stable transfections were selected using puromycin at 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 7 days. We then select clones with the lowest lncRNA-HAL expression. Three clones for each lncRNA were selected and pooled cell lines are hereafter named shlncRNA-HAL1 and shlncRNA-HAL2.

### 2.3. Real time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Cat. 15596026, Thermo, MA, USA), and cDNA synthesized was performed with 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse transcription kit, Thermo (4,368,813, MA, USA) following manufacturer's instruction. The PCR Primers used are shown in Supplementary Table 1. After an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, we performed 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min, using the SYBR Select Master Mix, Thermo (Cat 4472, MA, USA).

### 2.4. Hypoxia, acidosis and serum deprivation conditions

For hypoxic conditions MCF7 cells were seeded at 70% confluence and were transferred to a Bactrox hypoxia chamber, 13.7 Cu.Ft. 388 L (Chel Lab, OR, USA), with oxygen levels adjusted to 1%, 0.5% and 0.1% during 24 h. For the hypoxia survival assays, 10,000 MCF7 cells (shlncRNA-HAL and shLuc) were seeded in 96-well plates and after 24 h under the three different hypoxic conditions used, cell viability was analyzed using the MTS assay (Cell titer 96 Aqueous Non-radioactive cell proliferation assay (G5430, Promega, WI, USA)) following manufacturer's instructions. For 2-Methoxy-estradiol HIF-1 inhibition assay, we added 2-methoxy-estradiol at 5 $\mu\text{M}$  and 10 $\mu\text{M}$  final concentration just prior incubation under 0.1%  $\text{O}_2$  hypoxia for 24 h.

For acidosis assays RPMI 1640 medium was buffered with HEPES (35 mM) and the pH adjusted to 7.4, 6.9, 6.7 and 6.5 with HCl. Cells were seeded at 70% of confluence and incubated with the acidotic media for 24 h. Serum deprivation survival assay were performed with 5000 MCF7 cells (shHAL and shLuc) were seeded in 96 well plates and 24 h later culture media was changed for RPMI 1640 without FBS and phenol red. Cultures were maintained during 5 and 7 days, renewing culture media every 2 days.

### 2.5. Flow cytometry immunophenotype assay

For CD44/CD24 immunophenotype analysis, MCF7 cells cultured in monolayer were trypsinized and counted.  $1 \times 10^6$  cells were stained with anti-CD44-FITC (1:10) (130-095-195) (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) and anti-CD24-PE (1:5) (555428) (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) for 30 min. After staining,  $5 \times 10^4$  events were analyzed in FACS Aria cytometer (Becton Dickinson, CA, EUA). For FACS separation of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> populations, MCTS were disaggregated and cells were stained and analyzed as described above. CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> populations were gated and sorted in separated tubes. The Ki67/p27 analysis was performed as indicated previously [4]. Separation of spheroids different populations was done by cell sorting using a FACSaria Cytometer. After cell sorting different populations were collected by centrifugation and RNA was extracted. Gene expression spheroid different populations was done as described in previous sections.

### 2.6. Microdissection of internal and external layers of spheroids

Twenty-day culture spheroids washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde were embedded in paraffin. To separate the main proliferative layer (Ki67+ cells), spheroids sizing 350–420  $\mu\text{m}$  in diameter were circularly sectioned at 45–50  $\mu\text{m}$  from the edge by laser microdissection (P.A.L.M. Microlaser. Carl Zeiss MicroImaging.

Bernreid, Germany, GmbH). Settings used for laser cutting were: Speed of 20, Energy of 68 and Focus of 83. Outside spheroid layer was cut under a  $10\times$  objective [18]. Outer layers from eighty microdissected spheroids were scraped by means of a 27G needle and material was collected into 500- $\mu$ l of RNALater solution (Ambion, Austin, TX), the same procedure was followed for inner layers (Fig. A photography).

## 2.7. RNA-seq transcriptome analysis

Five million cells were used for RNA extraction using Trizol as indicated by manufacturer (Cat. 15596026, Thermo, MA, USA). Ribosomal RNA was removed with the Ribo-Zero rRNA Removal Kit following manufacturer's instructions (Cat MRZH116, Illumina, CA, USA). cDNA libraries were constructed using the TruSeq Stranded total RNA library prep kit following manufacturer's instructions (RS-122-2201, Illumina, CA, USA), quantified by fluorometry (Qubit fluorometer, Invitrogen) and sequenced in a NextSeq 500 (Illumina, CA, USA). After cleaning the reads, RNA-seq data were mapped to human genome using Star aligner [19]. Empirical analysis of differential gene expression was calculated using EdgeR algorithm [20]. Causal network analysis and biological process analysis was done using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [21].

## 2.8. Cell cycle and TUNEL analysis

For cell cycle and TUNEL assays, lncRNA-HAL-silenced and shLuc MCF7 cells were grown for 96 h in monolayer cultures. Cells were then trypsinized and simultaneous propidium iodide and TUNEL stain was done using the APO-BrdU TUNEL Assay kit (A23210, Thermo, MA, USA) following manufacturer's instructions in a FACSaria cytometer (BD, CA, EUA). Obtained Data was analyzed with ModFit software for cell cycle profile and with FlowJo for TUNEL analysis.

## 2.9. Migration and fluorescent gelatin degradation assay

Migration analysis was done using a modified Boyden chamber assay. Briefly, 24 h before the assay, cells were deprived of serum and phenol red and  $3.5 \times 10^4$  cells were seeded inside each transwell insert (transwell 0.8  $\mu$ m pore, 3422, Corning, NY, USA) with RPMI 1640 without SFB. The lower chamber contained RPMI 1640 with 15% FBS. Migration system was cultured for 24 h, cells in the upper chamber were detached, while cells in the lower chamber were fixed with 4% PFA and stained with crystal violet, finally, migrated cells were counted in a stereoscopic microscope. Fluorescent gelatin degradation assay, we performed following experimental procedure described previously [4].

## 2.10. Soft agar clonogenicity assay

Colony forming assay was done as described previously [22]. Briefly, 5000 lncRNA-HAL-silenced MCF7 cells were seeded in DMEM medium containing 0.3% low melting point (LMP) agarose; the mixture was placed in a 6 well plate with DMEM containing 0.5% LMP agarose. After 28 days of culture, colonies were stained with 1 mL of 0.1% crystal violet and counted using ImageJ Software.

## 2.11. Mammospheres formation assay

For clonogenic spheroid assays,  $2 \times 10^4$  cells were seeded in non-adherent suspension culture flasks using Mammocult medium (Cat 05620, StemCell Technologies, BC, Canada) supplemented with 0.48  $\mu$ g/ml hydrocortisone and 4  $\mu$ g/ml of heparin. Spheroids diameter was measured every day and after 7 days of culture they were counted using a stereoscopic microscope.

## 2.12. lncRNA-HAL expression in breast cancer samples

RNASeq data were obtained from SRA (GEO Project GSE58135) [23]. Briefly, fastq files from 56 normal and 84 tumoral samples (42 estrogen-positive and 42 triple-negative samples) were cleaned and aligned to the GRCh38 human genome assembly using the STAR algorithm [19]. Raw data were then normalized, quantified and assessed for differential expression using RSEM/EBSeq [24,25].

## 2.13. Zebra fish husbandry and xenotransplants assays

Wild Type AB zebrafish were bred and maintained in standard conditions (Temperature, 28.5 °C; PH 7.2–7.4; 12 h on and 12 h off light cycle). Fertilized eggs were obtained by natural crosses and two days' post-fertilization (dpf) embryos were dechorionated and anesthetized with tricaine (MS-222; Sigma, Mexico). MCF7-Luc, MCF7-ShRNA-HAL-1 and MCF7-ShRNA-HAL-2 cells were harvested at a concentration of  $5 \times 10^7$  cells/ml. This mixture was loaded into a borosilicate glass needle pulled by a Flaming/Brown micropipette puller. A 5–10 nanoliter suspension containing 200, 300 or 500 cells was implanted into each zebrafish embryo through the yolk space in a single injection using an electronically regulated air-pressure microinjector. After injection, zebrafish were washed once and maintained at 34 °C. Embryos were monitored for five days post injection (dpi) for tumor formation and documented. The proportion of individuals that formed tumors in each group was related to the tumorigenic capacity of the injected cells. Statistical analysis was done using ELDA software [26]. This study has been approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Medicina Genómica, (México) No. CEI 2014/24. All procedures performed on animals followed INMEGEN's approved protocols for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) (09/2015/I).

## 2.14. ChIRP assay

ChIRP experiments was done as described previously [27]. Briefly, 28 biotinylated probes were designed targeting lncRNA-HAL, one probe for every 100 nt and two probes targeting HPRT mRNA (Sup Table 3). Probes targeting lncRNA-HAL were split into odd and pair pools. Eighty million cells were harvested for lncRNA-HAL and HPRT ChIRP, lysed and sonicated in a Vibracell sonicator (Sonics and materials, CT, USA) for 1 h at a 70% amplitude. lncRNA-HAL and its interacting proteins were precipitated using MyOne Streptavidin Magnetic Beads (Invitrogen, Ca, USA). RNA was isolated using Trizol, and proteins were eluted by boiling the samples in 1  $\times$  laemmli buffer by 15 min. lncRNA-HAL isolation was validated by RT-qPCR analysis, and proteins were run in a silver-stained SDS-PAGE stained and subjected to Mass Spectroscopy. From the list of identified proteins, we discarded those present in negative controls, and selected only proteins present in all the lncRNA-HAL ChIRP experiments with both probe sets.

## 2.15. Key resources table

Resource	Source	Identifier
MCF-7, T47D, MDA-MB-453 Breast cancer cell lines	ATCC	STR genetic profile, to verify the authenticity of the human cell lines

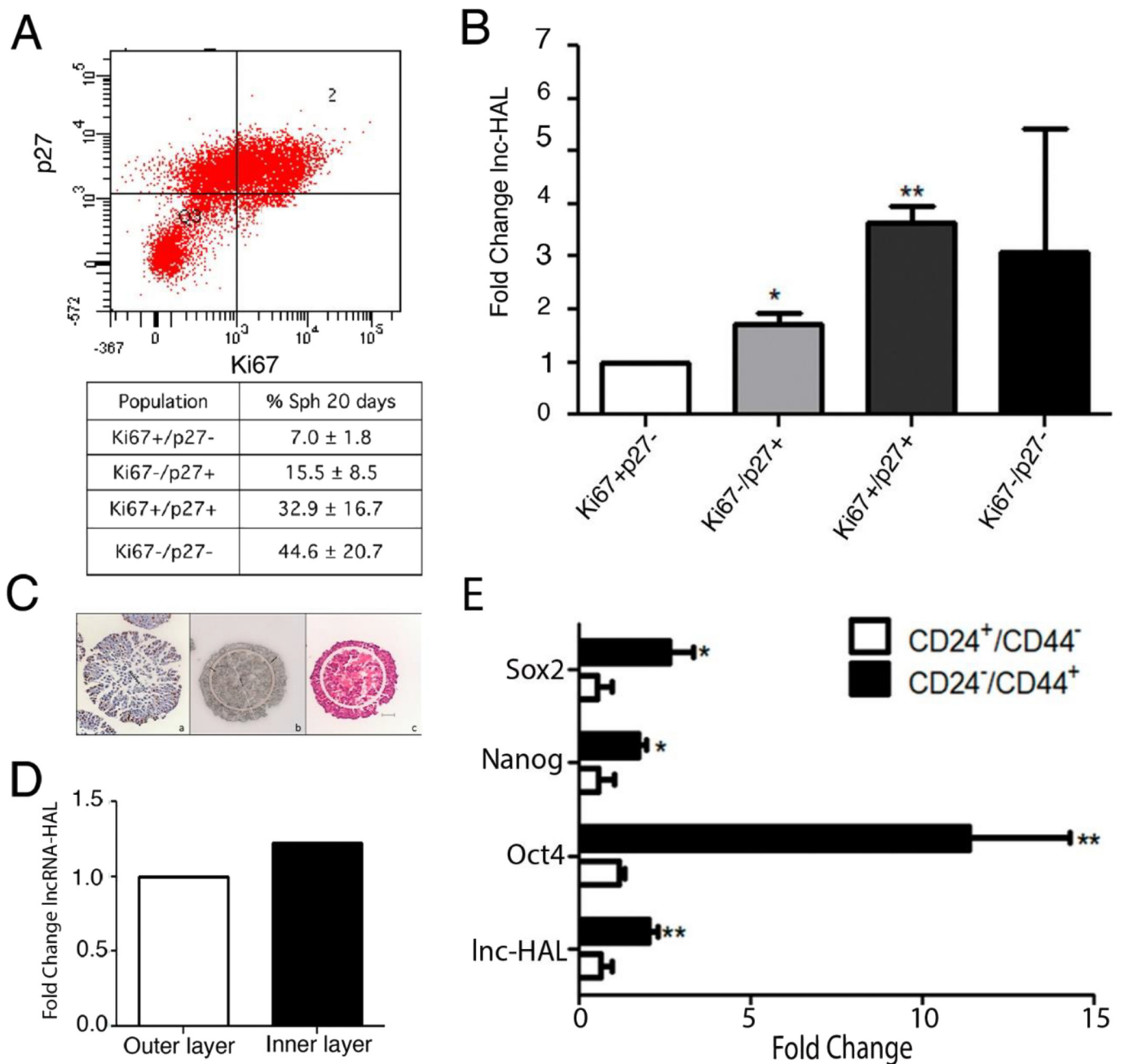
## 3. Results

### 3.1. lncRNA-HAL is regulated by MCTS microenvironmental conditions

Breast cancer cells grown as spheroids in 3D provide a hostile microenvironment leading to increased tumorigenic features [28]. We have recently reported that MCF7 spheroids exhibit a non-coding







**Fig. 2.** Expression of lncRNA-HAL in different regions and cell populations of MCF7 spheroids. A) Ki67 and p27 dot plot of 20-day spheroid-derived MCF7 cells B) Expression analysis by RT-qPCR of lncRNA-HAL in different cell populations of MCF7 spheroids, statistical analysis by one-way ANOVA,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ . C) FFPE sections of spheroids used for laser microdissection; the middle and right panels show the sections isolated from spheroids, internal (\*) and external (+). D) Relative expression of lncRNA-HAL in the inner and outer sections of 20 days MCF7 spheroids. E) Expression analysis of lncRNA-HAL, and three CSC marker genes (Oct4, Sox2 and Nanog) in  $CD44^+/CD24^-$  and  $CD44^-/CD24^+$  populations of MCTS.

expression profile that is profoundly altered compared to monolayer cultures [4,16]. In the present work we focused on one non-coding RNA, lncRNA-HAL, which is regulated in three consecutive time points and displays a fold change  $> 2$ . Since lncRNA-HAL expression level increased during MCTS growth, we hypothesized its potential implication in the tumorigenic phenotype changes observed in MCTS [28].

In-silico-analysis revealed that lncRNA-HAL is an intronic lncRNA located in the MAX Network Transcriptional repressor (MNT) gene (Fig. 1A; NONHSAT144953.1, NONCODE accession number) [29]. As expected from a transcriptional unit, we found specific upstream locations of active chromatin marks, i.e. H3K4me3 found in promoters, H3K36me3 in the gene body and H3K27me3, also found in promoters,

in MCF7 derived MCTS obtained from ChIP-seq data from the Bernstein laboratory (Broad institute) [30]; these were independent from those in the MNT gene and (Fig. 1A). NONCODE and Annonc databases revealed that this transcript is expressed mainly in testes, placental and adrenal normal tissues [21], lung squamous cell carcinoma, multiple myeloma and, more interesting, in breast invasive carcinoma [31].

As a first step, we validated the expression changes found previously [4,16] by growing MCF7 as MCTS cultures for 20 days, reaching a diameter of 450  $\mu\text{m}$  (Fig. 1B). These MCTS were selected after 6, 10, and 20 days of culture, showing that the expression level of lncRNA-HAL is increased significantly at later stages of spheroid growth (10 and 20 days of culture) (Fig. 1C), in which a clear zonal heterogeneity had

been established due to hypoxic conditions (Supplementary Fig. 1A). This suggested that lncRNA-HAL could be regulated by hypoxia and/or acidosis conditions present in these stages [5,32]. To determine if hypoxia could be responsible for the increased lncRNA-HAL expression in MCTS, first we analyzed the lncRNA-HAL promoter for hypoxia response elements (HRE's), including ARNT binding sites (ARNT is also known as HIF-1 $\beta$ ); using PROMO software, we found three highly significant HRE's in the lncRNA-HAL promoter (Supplementary Fig. 1B) [33]. Afterwards, we incubated MCF7 and MDA-MB-231 cells (which have a lower basal lncRNA-HAL expression, Supplementary Fig. 2A) under hypoxic conditions (1%, 0.5%, and 0.1% O<sub>2</sub>), and compared the expression of lncRNA-HAL with a normoxic control (atmospheric [O<sub>2</sub>]) by RT-qPCR. We found that lncRNA-HAL expression was increased in all the evaluated hypoxic conditions (Fig. 1D, Supplementary Fig. 1C). The hypoxic increase in lncRNA-HAL expression was validating using BT20 small normoxic spheroids and HeLa large normoxic spheroids, we only observed an increase in lncRNA-HAL expression in hypoxic HeLa spheroids (data not shown). To evaluate if the increased expression of lncRNA-HAL under hypoxic conditions was mediated by HIF-1, we cultured MCF-7 cells under severe hypoxia (0.1% O<sub>2</sub>) and added a pharmacological inhibitor of HIF (2-methoxy-estradiol) [34,35]. As expected, we found a decrease in the expression of three HIF-1 target genes, in particular HK2 and ABCB1 (Fig. 1E). Interestingly, lncRNA-HAL showed sensitivity to the used doses of 2-methoxy-estradiol (Fig. 1E) but without a dose-response effect, suggesting that although lncRNA-HAL is regulated by HIF-1, additional hypoxia-responsive transcription factors could be involved [36].

Since hypoxia also induces acidification of the culture media, derived from the acidotic environment due to MCTS culture, we evaluated if acidosis could also increase the expression of lncRNA-HAL. We cultured MCF7 cells in MCTS in RPMI-1640 with pH values resembling the acidosis level commonly observed *in vivo* (pH 6.5, 6.7, and 6.9) [37]. However, the expression of lncRNA-HAL was not modified in any of the tested conditions (Fig. 1F).

### 3.2. The expression of lncRNA-HAL is mainly observed in quiescent p27<sup>+</sup> cell populations in MCTS

MCTS are composed by different cancer-cell populations (proliferative, quiescent, and necrotic). We and others have previously observed that these populations can be distinguished based in the expression of proliferative and quiescence markers such as Ki67 and p27 [4,38]. To evaluate if the expression of lncRNA-HAL is restricted to a specific population, we used flow cytometry to separate 20 days MCTS cells based on the expression of Ki67 and p27. We observed, as previously reported, that 20 days MCTS were composed of four populations: a Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>-</sup> proliferative population which is the less abundant (3%), a 15% of Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup> G<sub>0</sub>-quiescent population [39–41], a 33% of Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup> population which is entering into quiescence [42], and a 44% of Ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup> quiescent population preparing to enter again into G<sub>1</sub>; this is the most abundant population in 3D cultures (Fig. 2A) [4]. Interestingly, the expression of lncRNA-HAL was higher in the transition to quiescence and quiescent cell populations (Fig. 2B). These results showed that both quiescence and lncRNA-HAL expression are induced after 3D cell growth giving rise to hypoxic conditions. Several examples of hypoxia-induced promotion of a dedifferentiated phenotype have been reported in breast cancer [43].

Due to the spatial arrangement of the quiescent/hypoxic populations within the intermediate layer of the MCTS, we decided to confirm if lncRNA-HAL is preferably expressed in this layer. We microdissected the external (50  $\mu$ m) and internal layers (400  $\mu$ m) of the MCTS (Fig. 2C), finding a higher expression of lncRNA-HAL in the inner fraction of the MCTS (Fig. 2D).

Finally, as we observed that lncRNA-HAL was expressed in the internal quiescent population of MCTS, we evaluated if this lncRNA could also be present in the CSC population of MCTS. After separation of the

CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (CSC) and CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> (non-CSC) populations from 20-day MCTS by FACS [22], we found that lncRNA-HAL expression was higher in the CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> population, a behavior similar to that of the stem-related Nanog mRNA (Fig. 2E). These results suggest that lncRNA-HAL could be expressed mainly in a CSC-quiescent population of MCTS.

### 3.3. lncRNA-HAL modifies the expression of genes implicated in proliferation and cell cycle progression

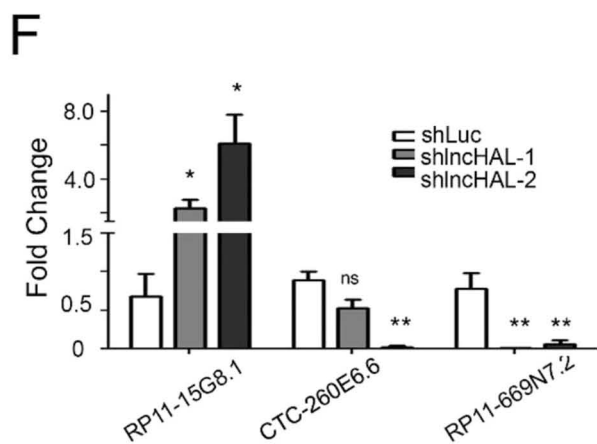
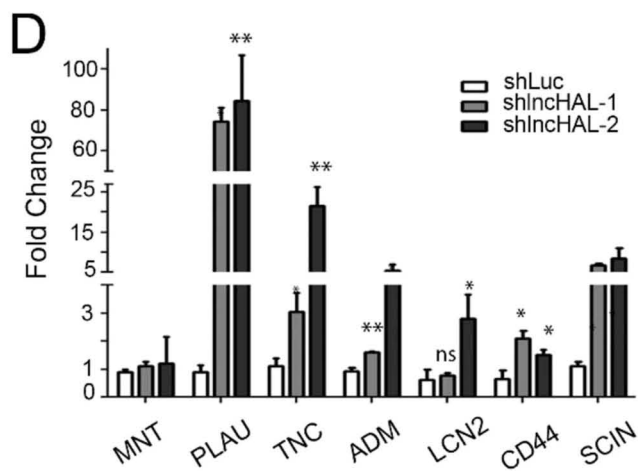
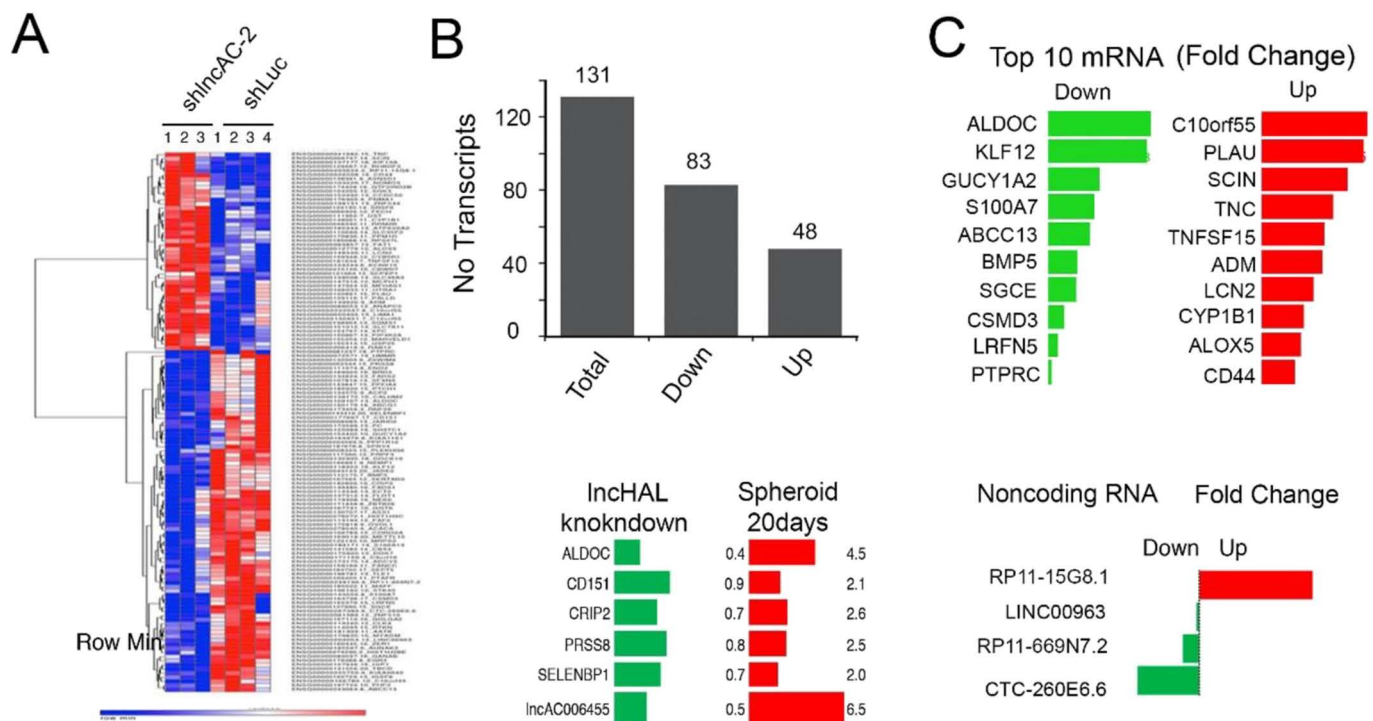
To study the biological processes modulated by lncRNA-HAL we performed knock-down analyses in MCF7 cells followed by RNA-seq assays. We designed and cloned two shRNAs targeting lncRNA-HAL (shlncRNA-HAL-1 and shlncRNA-HAL-2) and generated stable transfectants for each shRNA. We silenced ~50% of lncRNA-HAL expression with each shRNA when compared against the control (shLuc) (Supplementary Fig. 2B). lncRNA-HAL knockdown changed the expression of 131 genes (a heat map is shown in Fig. 3A), where 83 genes decreased and 48 increased their expression (Fig. 3B upper panel); the complete list of deregulated genes is shown in supplementary Table 1. Interestingly, 5 of the downregulated mRNAs after lncRNA-HAL knockdown in MCF-7 cell monolayer were also upregulated in MCTS, which exhibited high expression level of lncRNA-HAL (Fig. 3B, lower panel), suggesting that lncRNA-HAL could be a regulator of these genes. Interestingly, these 5 mRNAs were associated with the IFN $\gamma$  and TGF $\beta$ 1 signaling pathways when analyzed by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Supplementary Fig. 3).

In Fig. 3C, we show the top ten up and downregulated genes in shlncRNA-HAL/MCF7 cells. Twelve of these genes are associated with breast cancer (Supplementary Table 2). Interestingly, four of the dysregulated genes were non-coding (nc) RNAs, suggesting the participation of coding and non-coding genes in the cellular functions of lncRNA-HAL (Fig. 3C, lower panel). To validate the obtained RNA-seq data, we selected a group of 7 top upregulated and 5 top downregulated genes and analyzed their expression in shlncRNA-HAL-1 and shlncRNA-HAL-2 cells by RT-qPCR. The validation rate was 100% in both shRNAs (Fig. 3D and E). We also validated the expression changes of three ncRNAs (FCh > 2), including (CTC-260E6.6) which has been previously involved with breast cancer (Fig. 3F) [44]. Since the lncRNA-HAL gene resides within an intron of the MNT gene, we sought to exclude the effect of lncRNA-HAL knockdown on the expression of the MNT gene by RT-qPCR analysis, finding that MNT expression was not compromised (Fig. 3D).

To evaluate the biological relevance of the obtained RNA-seq data, we used a causal network approach with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool [21]. This analysis indicated that the lncRNA-HAL knockdown affected 5 main cellular processes: cellular growth and proliferation, cell cycle, cellular migration, cell death and survival, and cellular assembly and organization (Fig. 3G).

### 3.4. lncRNA-HAL can regulate cell proliferation

The causal network modeled by IPA showed that several genes affected by lncRNA-HAL knockdown are implicated in the regulation of tumor cell proliferation (Fig. 4A). Interestingly, urokinase-type plasminogen activator (PAU), the most upregulated gene, has been strongly associated with cell proliferation in breast cancer [45]. As shown in Fig. 4B lncRNA-HAL knockdown induced an increase in cell number when compared to the shLuc control. This was not due to cell death differences since we did not find changes in the proportion of apoptotic cells (Fig. 4C). A cell cycle analysis showed that lncRNA-HAL silencing increased the proportion of cells in the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle (Fig. 4D). Furthermore, silencing of lncRNA-HAL produced a significant increment in the size of MCTS at late stages (Fig. 4E–F). These results suggest that lncRNA-HAL overexpression observed in the p27<sup>+</sup> population of MCTS could be implicated in the quiescent phenotype of the



**G**

Molecular and Cellular Functions	
Name	No. of molecules
Cellular Growth and proliferation	57
Cell Cycle	19
Cellular movement	35
Cell death and survival	46
Cellular assembly and organization	29

(caption on next page)

**Fig. 3.** Transcriptome of MCF7 cells after lncRNA-HAL knock-down. A) Heatmap showing the expression profile of the 131 knock-down affected genes. B) Upper panel shows the number of genes up- and down-regulated by lncRNA-HAL knock-down. Lower panel shows the genes whose expression were modified in 20-day-spheroids and presented an inverse expression change in the lncRNA-HAL knock-down experiments. C) Fold change of the top ten up- and downregulated mRNAs and non-coding RNAs. D) Validation by RT-qPCR of 6 upregulated genes; statistical analysis Student's *t*-test, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . E) Validation by RT-qPCR of 5 downregulated genes, statistical analysis Student's *t*-test, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . F) Validation by RT-qPCR of three dysregulated ncRNA; statistical analysis Student's *t*-test, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . G) IPA-predicted molecular and cellular processes modulated after lncRNA-HAL knock-down.

inner layers of the 3D culture.

### 3.5. lncRNA-HAL regulates the migration/invasion of MCF7 cells

Migration was one of the main cellular processes enriched in the RNA-seq experiments of lncRNA-HAL knockdown experiments (Fig. 3G). The network predicted by IPA software indicated that PLAU and TNC could be involved in the migratory effects of lncRNA-HAL (Fig. 5A). To evaluate this, we performed a migration assay using 10% Fetal Bovine Serum as chemoattractant. We found that lncRNA-HAL silencing induced fewer migrating cells when compared with the shLuc control (Fig. 5B, Supplementary Fig. 5A). We next evaluated the ability for extracellular matrix (ECM) degradation of these cells using a gelatin degradation assay. Moreover, we observed that lncRNA-HAL silencing increased the gelatin degradation capacity of MCF7 cells (Fig. 5C, Supplementary Fig. 5B).

### 3.6. lncRNA-HAL reduces cell survival capability under stress

During the late stages of MCTS formation, cells from the inner region must survive the adverse microenvironmental stimuli, such as low concentration of nutrients and growth factors, hypoxia, and acidosis. Based on the cellular process predicted by IPA software, such as cell death and pro-survival AKT and NF- $\kappa$ B cascades (Fig. 5D), we hypothesized that lncRNA-HAL could be implicated in the survival mechanisms necessary in these microenvironmental conditions. To this end, we addressed the impact of this lncRNA on the survival capability of MCF7 cells under growth factor deprivation and hypoxia. As shown in Fig. 5E, we found that the inhibition of lncRNA-HAL increased the survival capability of MCF7 cells after 5 days of serum deprivation (Fig. 5E). To determine if this effect was not limited to serum deprivation, we evaluated if lncRNA-HAL silencing could affect the survival of MCF7 cells under three different hypoxic conditions (1%, 0.5% and 0.1% O<sub>2</sub>). Interestingly, silencing of lncRNA-HAL increased the survival of MCF7 cells in all tested hypoxic conditions (Fig. 5F). It has been previously reported that cancer cells cultured as MCTS can acquire increased resistance to antitumor drugs (termed multicellular resistance) [46]; therefore, we evaluated the expression of lncRNA-HAL in MCF7 cell clones resistant to the commonly used antineoplastic agents Cisplatin, Tamoxifen, Paclitaxel and Doxorubicin. As shown in Fig. 5G, we did not find any difference in lncRNA-HAL expression in these resistant cells. Overall, we found that lncRNA-HAL expression in spheroids was associated with hypoxia and a low proliferation index, although not with resistance to cell death due to exposure to anti-neoplastic drugs.

### 3.7. lncRNA-HAL is implicated in the cancer stem cell phenotype

There is evidence suggesting that Cancer Stem Cells (CSC) are enriched within the quiescent MCTS population [47]. Since it is the same population in which we found increased lncRNA-HAL levels, we evaluated if this lncRNA could be implicated in the maintenance of this CSC population. First, we determined the CSC percentage in lncRNA-HAL-silenced MCF7 cells using the previously reported CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> immunophenotype [48] and observed that lncRNA-HAL silencing caused an important decrement in the CSC population when compared to the shLuc control (Fig. 6A). Moreover, we found decreased expression of stem markers Sox2, Nanog and Aldh1A3 (Fig. 6B upper panel).

However, in MCTS we observed a decreased expression of Nanog and Aldh1A3, but not Sox2, in response to lncRNA-HAL silencing (Fig. 6B lower panel).

Then we evaluated if lncRNA-HAL could also be regulating clonogenic growth, an important characteristic of CSCs, by performing a soft agar clonogenicity assay; as expected, we found that lncRNA-HAL knockdown diminished the number of colonies (Fig. 6C). Interestingly, the colonies found in the shlncRNA-HAL cell lines were bigger than in the shLuc-derived and untransfected controls, possibly due to increased proliferation caused by lncRNA-HAL silencing (Fig. 6D).

To corroborate the association of lncRNA-HAL expression with a stem cell phenotype, we performed a mammospheres/clonogenic spheroid assay. As shown in Fig. 6E, we found that decreasing lncRNA-HAL expression resulted in lower number of mammospheres (Fig. 6E). As expected by the clonogenic experiments, mammospheres formed by shlncRNA-HAL cell lines were larger than control mammospheres (Fig. 6F and G).

### 3.8. Subcellular localization of lncRNA-HAL

To gain insight into the mechanism of lncRNA-HAL function, we determined its subcellular localization; as shown in the Supplementary Fig. 4, lncRNA-HAL has a cytoplasm-nuclear distribution in MCF7 2D cultures, although in MCTS cultures we observed an increased presence of lncRNA-HAL in the nuclear fraction at 6–10 days of culture, remaining until day 20.

### 3.9. lncRNA-HAL regulates tumor growth in vivo

To further corroborate the impact of lncRNA-HAL silencing over the stem cell phenotype of MCF7 cells, we used a xenotransplant model in zebra fish (*Danio rerio*), evaluating three limiting dilutions of 300, 400 and 500 injected cells per fish. As expected, we found that lncRNA-HAL silencing resulted in decreased number of tumor initiating cells, from 1 CSC per 547 tumor cells in shLuc control line to 1 CSC per 1300 tumor cells in lncRNA-HAL-silenced cell line (Fig. 7A, B) [26].

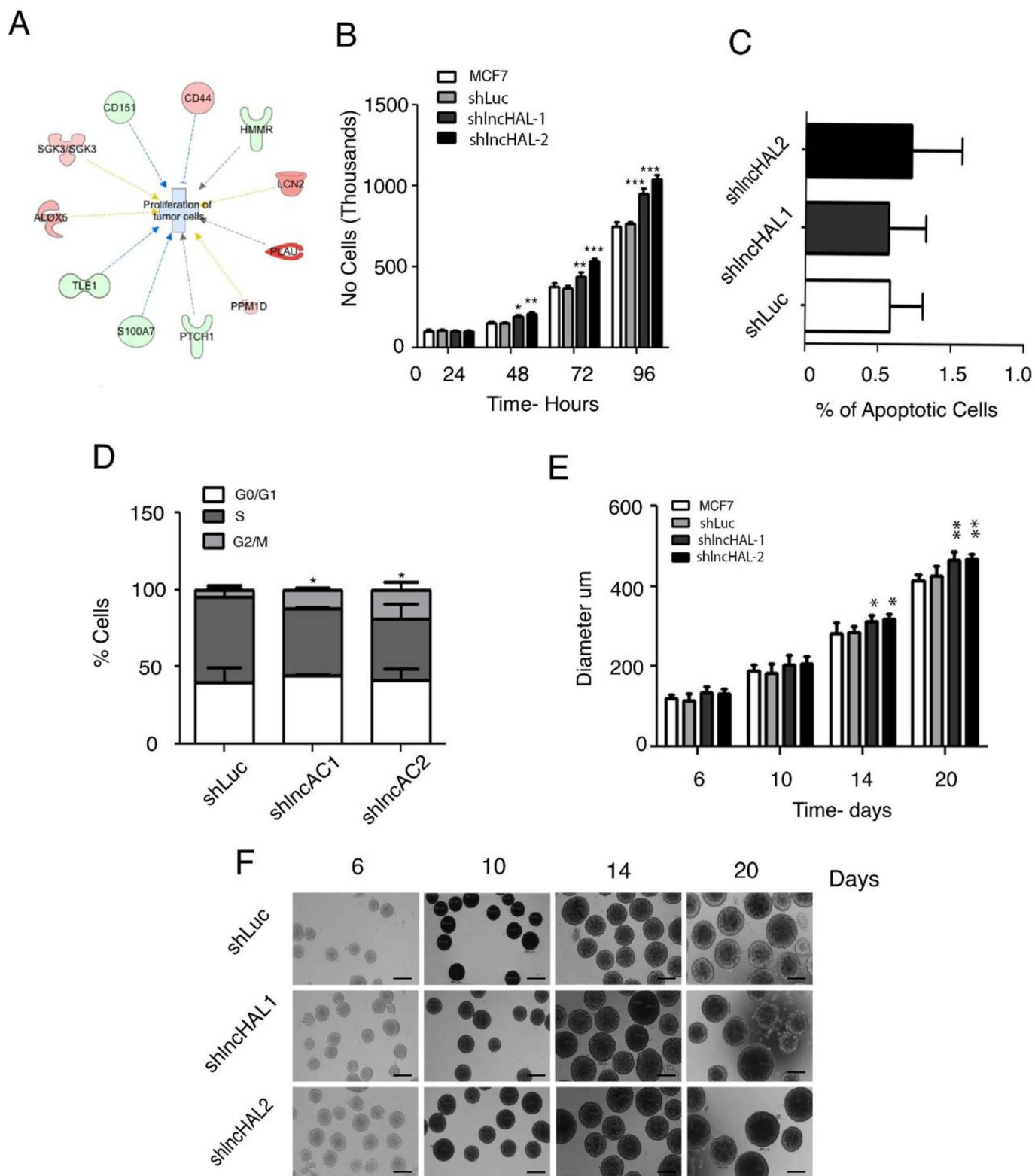
### 3.10. lncRNA-HAL expression is elevated in triple negative breast cancer tumors

To further support the potential role of lncRNA-HAL in cancer, we analyzed samples from a previously published cohort of 80 breast cancer patients [23]. As shown in Fig. 7C and D, lncRNA-HAL levels were higher in triple negative breast cancer samples in comparison with normal tissue samples (Fig. 7C and D), suggesting that lncRNA-HAL could be important for disease progression in breast cancer patients.

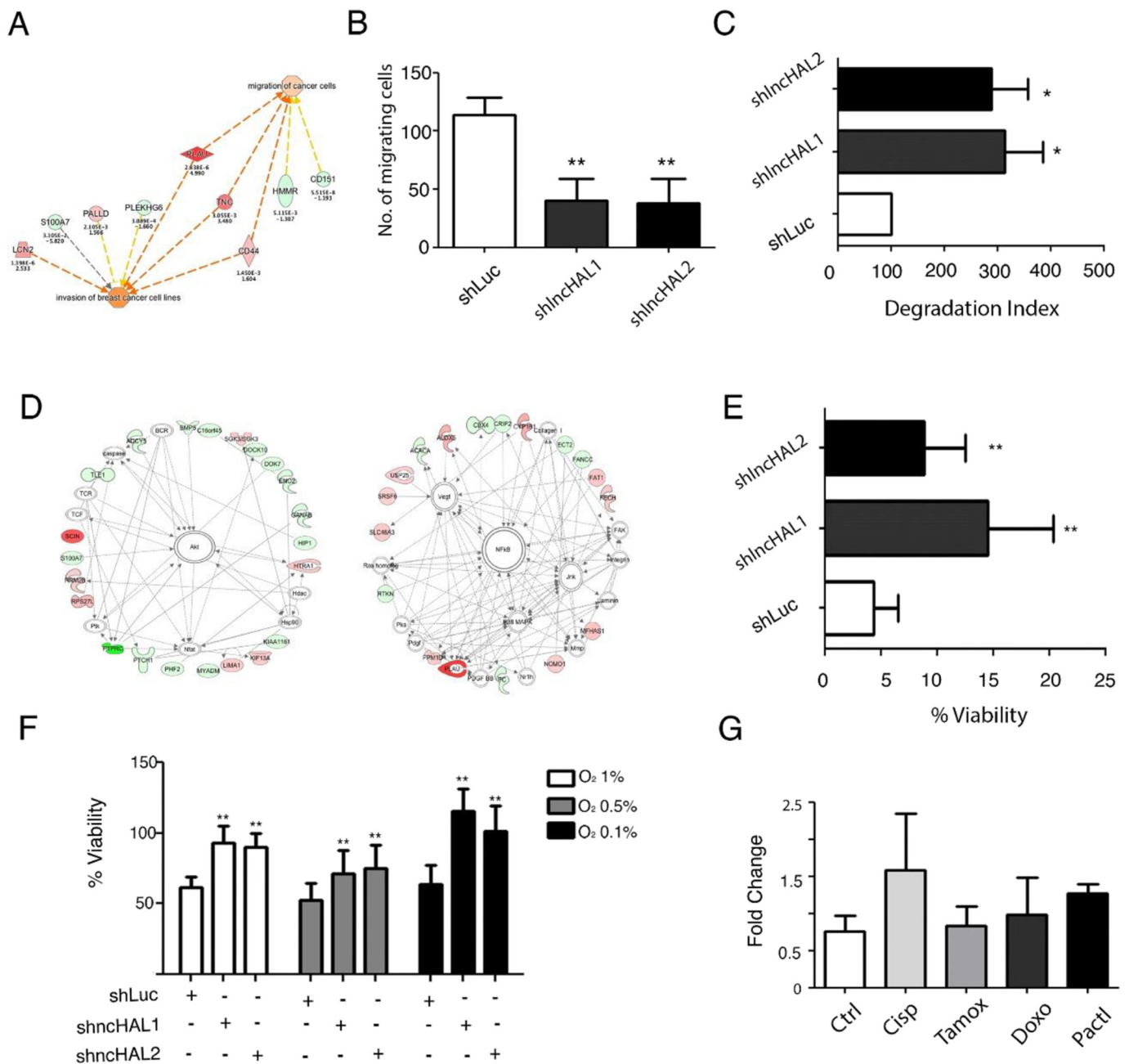
### 3.11. lncRNA-HAL interacts with different RNA binding proteins

To further elucidate the mechanism of action of lncRNA-HAL, we sought to identify the lncRNA-HAL interacting proteins by a ChIRP assay [27]. We designed two probe sets aimed to the isolation of the lncRNA (odd probes and pair probes) and a probe set for isolating HPRT mRNA (negative control). We found that ChIRP experiments using lncRNA-HAL targeting probes retrieved approximately 50% of the input, compared with the 0.8% retrieved by HPRT targeting probes (Fig. 8A). SDS-PAGE analysis of eluted proteins showed that lncRNA-HAL could be interacting with several proteins (Supplementary Fig. 6).





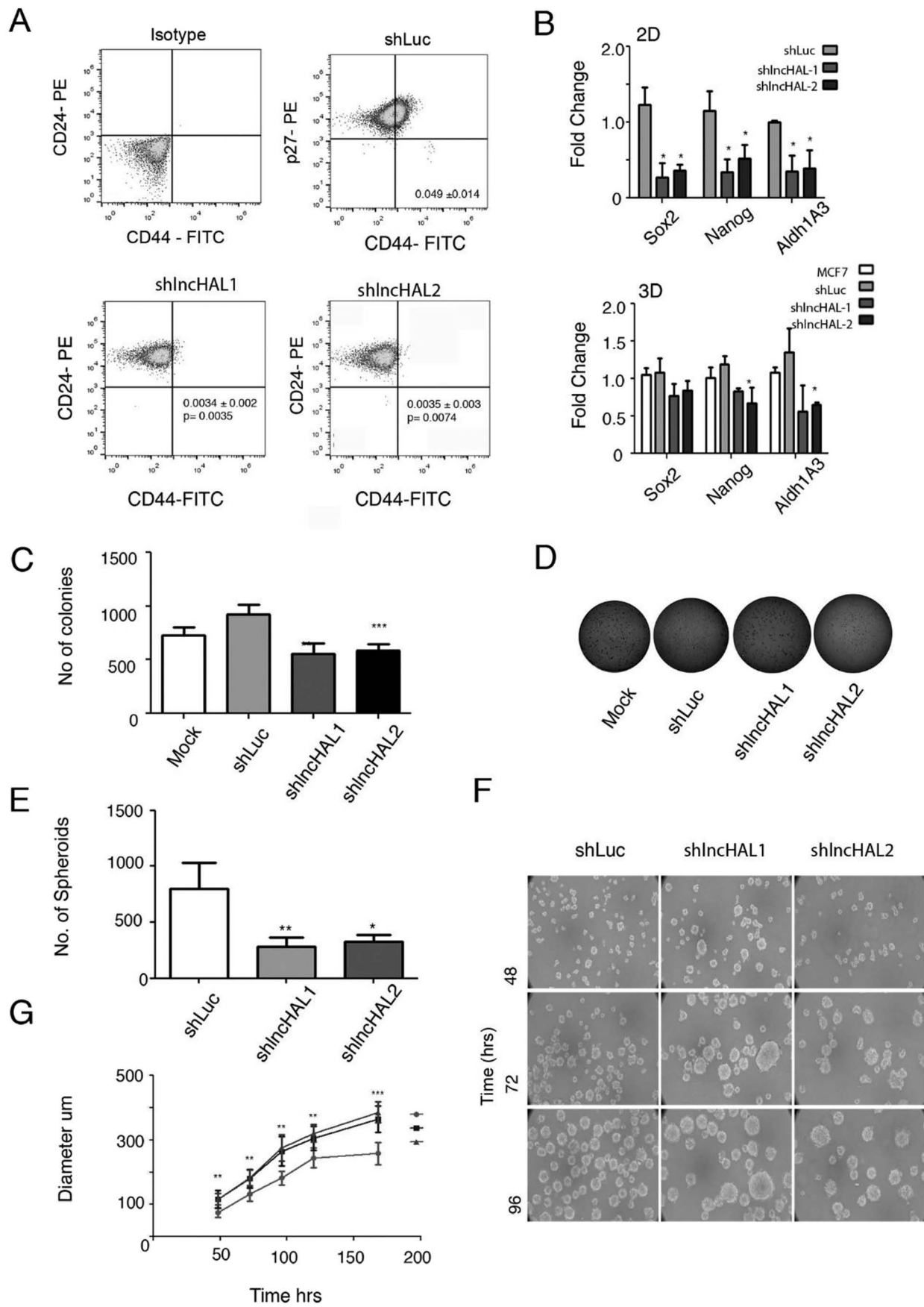
**Fig. 4.** Analysis of the effect of lncRNA-HAL knock-down on MCF7 cells proliferation. A) Molecules predicted to be involved in cell proliferation based on the IPA algorithm analysis. B) Growth curve in 2D culture of lncRNA-HAL-knock-down MCF7 cells; statistical analysis: two-way ANOVA,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.005$ . C) TUNEL assay of lncRNA-HAL-silenced MCF7 cells grown in standard 2D conditions; statistical analysis Student's *t*-test,  $*p \leq 0.005$ . D) Cell cycle profile by Propidium iodide staining of lncRNA-HAL knock-down MCF7 cells grown in standard 2D conditions, statistical analysis Student's *t*-test,  $*p \leq 0.005$ . E) Growth curve of spheroids of lncRNA-HAL-silenced MCF7 cells; statistical analysis: two-way ANOVA,  $*p \leq 0.005$ . F) Representative images of spheroids from control and lncRNA-HAL-knock-down cells; the scale bar corresponds to 200  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 5.** IncRNA-HAL knock-down on invasive phenotype and survival capacity. A) Molecules predicted to be involved in cell migration and invasion, based on IPA analyses. B) Migration assay in transwell chambers using IncRNA-HAL-knock-down MCF7 cells; statistical analysis: Student's *t*-test, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . C) Analysis of ECM degradation capability of IncRNA-HAL knock-down MCF7 cells, using fluorescein-marked gelatin; statistical analysis Student's *t*-test \* $p \leq 0.005$ . D) NF- $\kappa$ B and Akt pathways were modeled by IPA. E) Cell viability measured by MTS assay after 5-day serum starvation in IncRNA-HAL silenced MCF7 cells; statistical analysis: Student's *t*-test, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . F) Cell viability measured by MTS assay after 24 h of hypoxic stimulus in IncRNA-HAL knock-down cells; statistical analysis: two-way ANOVA, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . G) IncRNA-HAL expression analysis by RT-qPCR in MCF7 subclones which are resistant to Cisplatin, Paclitaxel, Tamoxifen and Doxorubicin, statistical analysis Student's *T*.

To determine the identity of IncRNA-HAL interacting proteins we analyzed the eluted proteins by mass spectroscopy. We found that IncRNA-HAL potentially interacted with four types of proteins: histones, hnRNP's, RNA helicases and the small GTPase RAN (Fig. 8B). The interaction with histones H2B and H1.2 suggests that IncRNA-HAL could be interacting directly with chromatin, maybe through the binding with specific DNA sequences. We also identified a potential interaction with three hnRNP's: hnRNPD, hnRNPA4 and hnRNPU, the later observed only in one probe set. The interaction with hnRNP's implies that IncRNA-HAL could be functioning as a transcriptional regulator of target genes, or as a regulator of unidentified mRNAs

stability [50–52]. Interestingly, it has been shown that hnRNPD can also interact with the NuRD complex to induce gene repression by HDAC1-mediated activity [52]. The potential interaction of IncRNA-HAL with the DDX5 and DDX17 RNA helicases could be also be associated with transcriptional regulation, since these two proteins have analogous functions as transcriptional coregulators of transcription factors such as ER $\alpha$ , p53 and MyoD [53]. Finally, even when the Ran GTPase has not been associated with transcriptional regulation, it has been reported that it is able to regulate RNA and protein trafficking between cytoplasm and nucleus [54] (Fig. 8B). Finally, an additional analysis of putative miRNA-IncRNA-HAL interactions using the StarMir



(caption on next page)

**Fig. 6.** Evaluation of the effect of lncRNA-HAL silencing in the cancer stem cell phenotype of MCF7 cells. A) CD44/CD24 immunophenotype assayed by cell cytometry in lncRNA-HAL-silenced MCF7 cells; statistical analysis: Student's *t*-test. B) Expression analysis of stem cell markers by RT-qPCR in lncRNA-HAL-knock-down MCF7 cells, Upper panel shows the expression in 2D culture and lower panel shows the expression in 3D spheroids culture; statistics by one-way ANOVA, \**p* < 0.005. C) Clonogenicity soft agar colony formation assays of lncRNA-HAL knock-down cells; statistical analysis: one-way ANOVA, \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01, \*\*\**p* ≤ 0.005. D) Representative images of soft agar colony formation assays. E) Clonogenicity analysis by clonogenic-spheroids formation assays using stem cell medium (MammoCult); statistical analysis by Student's *t*-test, \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01. F) Representative images of clonogenic-spheroids at different times; scale bars represent 200 μm. G) Growth curve of lncRNA-HAL-silenced and control clonogenic-spheroids of MCF7 cells; statistical analysis performed with two-way ANOVA, \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01, \*\*\**p* ≤ 0.005.

tool produced some candidates, but a comparison of these molecules with a list of 32 deregulated miRNAs previously detected in our MCTS model produced no coincidences. Thus, we ruled out the ability of lncRNA-HAL to function as ceRNA, at least in our model [4].

#### 4. Discussion

The tumor microenvironment plays a very important role on the behavior of tumor cells; this hostile microenvironment includes the lack of oxygen and nutrients in conjunction with acidosis, and it favors a more aggressive phenotype for tumoral cells [55]. There are several reports showing the importance of protein coding genes in the cellular adaptation to these hostile conditions; however, there is little information concerning non-coding RNAs.

In the present report we show evidence, for the first time, that lncRNA-HAL could be implicated in the 3D-elicited phenotypic features observed in breast tumors. We found that lncRNA-HAL is overexpressed in 3D cultures and human breast tumors. Specifically, lncRNA-HAL was expressed in the quiescent p27<sup>+</sup> intermediate layers of spheroids. A very interesting finding was the cell cycle distribution of the cell populations within the 3D culture. In this model, a large proportion of cells were beginning or exiting the G0 phase, as we found Ki67 and p27 double-positives and negatives. Currently, little is known about these populations at the cellular level. MCTS could be a good model to study them in detail.

Since quiescence in the MCTS is established mainly by low O<sub>2</sub> conditions and acidosis [56], we sought to assess if these conditions were responsible for the upregulation of this lncRNA. Interestingly, hypoxia, but not acidosis, was responsible for this upregulation, suggesting that an increased expression of lncRNA-HAL in hypoxic layers could reduce the proliferative capabilities of MCF7 cells, perhaps due to a delay in cell cycle progression (by arrested cells, such as ki67<sup>-</sup>/p27<sup>+</sup>) or by inducing a dynamic quiescent state (Ki67<sup>+</sup>/p27<sup>+</sup>, ki67<sup>-</sup>/p27<sup>-</sup>) (Fig. 2A). It is important to note that there are previous reports demonstrating the ability of a lncRNA to promote the acquisition of quiescence, such as GAS5 in T cells and mesothelioma tumors [57,58]. On the other hand, there are reports showing that lncRNAs can be hypoxia-responsive genes as well, such as in the case of lincRNA-p21 and LINK-A [10,59]. Our results suggest the involvement of lncRNA-HAL in providing a link between hypoxia and a quiescence. Changes in lncRNA-HAL levels were partially dependent on the HIF pathway since the changes were partially reversed with a HIF-1 (2-methoxy-estradiol) inhibitor. Also, our data suggest that hypoxia is the most important inductor of lncRNA-HAL expression, since BT20 normoxic spheroids does not increase lncRNA-HAL expression, but HeLa hypoxic spheroids shows an increase in lncRNA-HAL expression.

Quiescence is a cellular phenotypic trait strongly associated with tumoral stem cell populations [60]. It has been described that the pharmacological inhibition of HIF-1α decreases the proportion of CSCs in breast cancer xenografts and that hypoxia can induce the acquisition of more malignant traits in the CSC population of breast cancer cell lines [61,62]. Interestingly, several reports in different tumors indicates the existence of a quiescent CSC population important for tumor regrowth, metastasis, and chemotherapeutic resistance [63]. It has been observed that most stem cells in the mammary gland and breast cancer tumors are quiescent [60]. Using *in vitro* and *in vivo* assays we show that

the expression of lncRNA-HAL is associated with a stem population phenotype in the cell line MCF7, including increased expression of stemness markers, such as the expression of CD4 and CD24 proteins and NANOG mRNA levels; and higher clonogenic capacity *in vitro* and *in vivo*. These results make conceivable that this lncRNA could be a key regulator for the acquisition of hypoxia-mediated aggressiveness by CSCs in this neoplasia. Supporting this hypothesis, loss of function assays demonstrated the ability of lncRNA-HAL to increase the migration, although gelatin degradation was decreased. This scenario resemble the path-finding amoeboid mode, a type of migration in which cells modify their shape to squeeze through the extracellular matrix pores in which the commonly observed proteolytic activity is reduced or absent [64]. We observed that lncRNA-HAL silencing upregulates the expression of uPA, which could explain the increased ECM degradation observed in lncRNA-HAL silenced cells.

lncRNA-HAL silencing also increased the proliferative cell population. The presence of a little-known population of slow-cycling and self-renewing stem cells that transit to fast-cycling and non-self-renewing TACs (Transit-Amplifying Cell transition) has been shown within tumors [65].

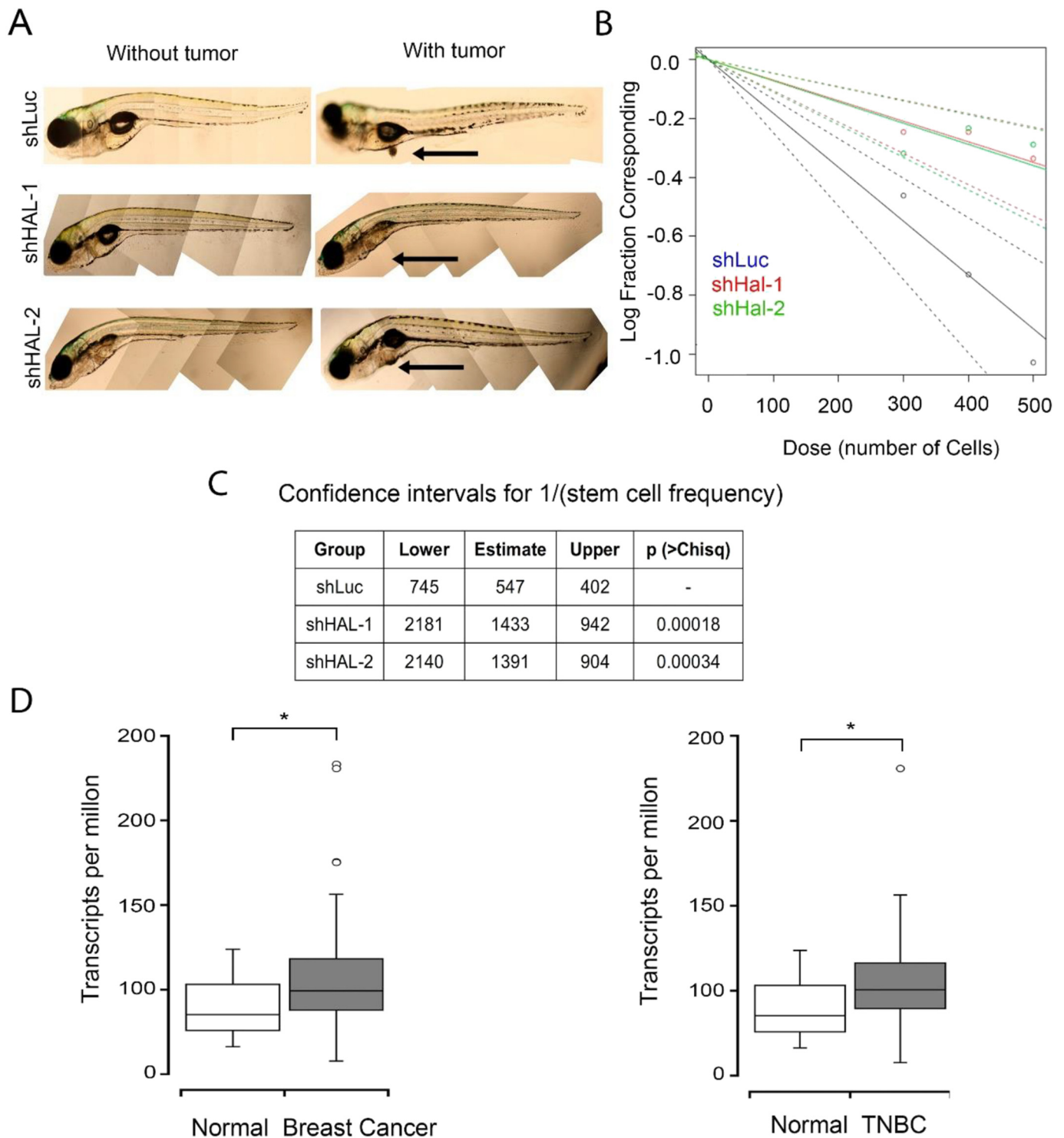
Interestingly, the ChIRP assay showed that lncRNA-HAL could be interacting with several proteins. First, we found that lncRNA-HAL associates with two different histones: H2B and H1.2, which suggest a direct binding of lncRNA-HAL to chromatin [66]. Interestingly, H1.2 has been previously associated with repressed chromatin in lamina-associated domains (LADs), functioning also H1.2 as a regulator of cell cycle progression [67]. This interaction could suggest that lncRNA-HAL could be implicated in the repression of some target genes, maybe by its localization at repressive domains. In addition, lncRNA-HAL could be binding to the ribonucleoproteins hnRNPU, hnRNPD and hnRNP-A3. hnRNPU is mainly associated with euchromatic regions bounded to the nuclear matrix [50]. It has been reported that hnRNPs interact with several lncRNAs, e.g., hnRNPU is associated with Firre, Blnc1 and PANDA and hnRNPD with lnc13, [68–70]. The putative interaction of lncRNA-HAL with H1.2, hnRNPU and hnRNPD, suggest that this transcript could be repressing the expression of some of its target genes.

In contrast, DDX5 and DDX17 are RNA helicases that activate transcription through the association with different transcription factors such as ERα, p53 and MyoD [71]. The interaction of DDX5/DDX17 with these transcription factors is regulated by a scaffold lncRNA called SRA, allowing the transactivation and expression of several ERα, p53 and MyoD target genes [72–74]. Also, DDX5/DDX17 transactivate the expression of the LXR target gene Abca1 through the association with MeXis lncRNA [74]. Our results suggest that lncRNA-HAL could modulated some target genes through its interaction with hnRNP's or activate the transcription of other genes through the interaction with DDX5/DDX17 proteins.

Finally, we found that lncRNA-HAL is overexpressed in triple-negative breast cancer patient samples. Since this subtype already presents a stem-like phenotype and more aggressive biological behavior, it would be of great interest to study if lncRNA-HAL mediates this aggressiveness [75]. Additional *in vivo* analyses are needed to establish the importance of this lncRNA in breast cancer progression.

The present work revealed evidence that lncRNA-HAL is regulated by hypoxic niches and implicated in the positive modulation of CSC phenotypes such as quiescence and increased migratory capacity.



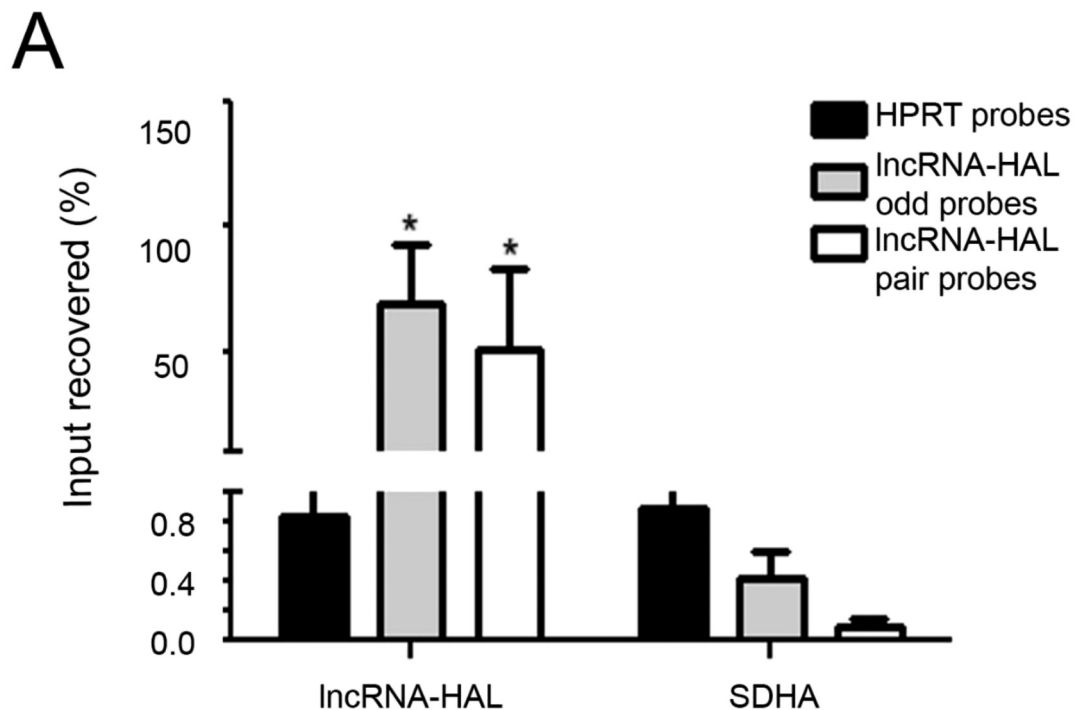


**Fig. 7.** Analysis of the effect of lncRNA-HAL in *in vivo* tumorigenicity of MCF7 cells. A) Representative images of *Danio rerio* 4-days embryos with and without tumors; black arrows show cell injection site (yolk sac) and tumor development. B) Extreme Limiting Dilution Assay (ELDA) analysis for cancer stem cell frequency estimation in lncRNA-HAL knock-down MCF7 cells [49]. C) lncRNA-HAL expression in breast cancer samples. Data were derived from [1] and processed as described in Material and Methods. lncRNA-HAL expression in normal breast and tumor samples in TPM (Transcripts per million) \* FDR = 0.0045, Fold Change 1.44 D) lncRNA-HAL expression in normal breast and Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) \* FDR = 0.043, Fold Change 1.43. No statistical difference in lncRNA-HAL was found between estrogen-receptor positive samples and normal breast tissue.

**5. Conclusions**

lncRNA-HAL is a previously uncharacterized lncRNA whose expression increase in a three-dimensional *in vitro* model (MCTS) due to the hypoxic regions generated. This transcript presents a specific

expression in the quiescent and stem cell populations of MCTS, suggesting a role in the acquisition of cellular heterogeneity in tumors. The functional analysis of this lncRNA revealed that it can interact with histones (H1.2 and H2B) and several RNA interacting proteins such as DDX5, DDX17, hnRNPU, hnRNPD and hnRNP-A3, which implies that



**B**

Protein	MW (kDa)	Peptides (#)	Coverage (%)	Intensity
<b>Histones</b>				
H2B	13.9	11	65.1	5.33E+09
H1.2	21.6	16	43.2	2.64E+10
<b>hnRNP's</b>				
hnRNPD	23.9	9	38.6	6.35E+09
hnRNPA3	39.6	13	38.6	1.02E+10
hnRNPU	89.0	30	41.8	2.13E+10
<b>RNA Helicases</b>				
DDX5	69.0	27	51.3	5.10E+09
DDX17	80.4	29	46.4	9.20E+09
<b>Small GTPases</b>				
RAN	26.2	9	39.1	6.12E+09

**Fig. 8.** Identification of the lncRNA-HAL interacting proteins. ChIRP experiments, using a negative probe set against HPRT mRNA, and two probe sets targeting lncRNA-HAL (lncHAL odd probes and lncHAL pair probes). A) Evaluation of the specificity of ChIRP assays by the evaluation of the retrieval of lncRNA-HAL in the negative control and the lncRNA-HAL targeting assays, using RT-qPCR for quantification. As control we analyzed the retrieval of a non-related mRNA, SDHA. B) Table showing the identity of lncRNA-HAL bound proteins obtained by Mass Spectroscopy analysis.

lncRNA-HAL could interact with chromatin and recruit these regulatory proteins to regulate gene expression. Modulating in this way key cellular processes such proliferation, migration, stress survival and stem cell phenotype.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118523>.

#### Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in online version.

#### Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## Acknowledgments

Thanks to Alfredo Mendoza Vargas and sequencing unit for RNA-seq library construction and sequencing; to Linda Nelly Patiño Uriostegui for FACs analyses and to José Luis Cruz Colin for his support in cell culture (Instituto Nacional de Medicina Genómica); to Magdalena Hernández for analyses of proteins. Thanks to Daniel Díaz, Ph.D. for his assistance in English language revision and proofreading.

## Funding

García Venzor Alfredo was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), number 384857 (CVU347666); this study is part of his Doctoral Thesis from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## Author contributions

GVA. Made substantial contributions to the conception and design of the study; analyzed the data and drafted the article. MTEA. Performed spheroid fractioning and sorting, experiments design and data analysis and interpretation. LZ.F. Performed the Fluorescent gelatin degradation assay and data analysis. ZC. Performed zebrafish experiments. SRM. Performed microdissection experiments. KE. Performed microdissection experiments. DBVM. Performed HIF inhibition experiments. EGS. Performed protein analysis by Mass Spectroscopy. MZJ. Participated in drafting the article and critical revision for important intellectual content. He also produced the bioinformatics analyses. MV. Made substantial contributions to the conception and design of the study, coordinated the work, analyzed the data and contributed to the manuscript draft.

## References

- O. Ginsburg, F. Bray, M.P. Coleman, V. Vanderpuye, A. Eniu, S.R. Kotha, M. Sarker, T.T. Huong, C. Allemani, A. Dvaladze, J. Gralow, K. Yeates, C. Taylor, N. Oomman, S. Krishnan, R. Sullivan, D. Kombe, M.M. Blas, G. Parham, N. Kassami, L. Conteh, The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health, *Lancet* 389 (2017) 847–860.
- S.K. Deshmukh, S.K. Srivastava, N. Tyagi, A. Ahmad, A.P. Singh, A.A. Ghadhbhan, D.L. Dyess, J.E. Carter, K. Dugger, S. Singh, Emerging evidence for the role of differential tumor microenvironment in breast cancer racial disparity: a closer look at the surroundings, *Carcinogenesis* 38 (8) (2017) 757–765.
- G.L. Semenza, The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2016) 382–391.
- E.A. Mandujano-Tinoco, A. García-Venzor, L. Muñoz-Galindo, F. Lizarraga-Sanchez, A. Favela-Orozco, E. Chavez-Gutierrez, E. Krotzsch, R.M. Salgado, J. Melendez-Zajgla, V. Maldonado, miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids, *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (10) (2017) 1642–1655.
- S. Riffle, R.N. Pandey, M. Albert, R.S. Hegde, Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids, *BMC Cancer* 17 (2017) 338.
- S.W. Cheetham, F. Gruhl, J.S. Mattick, M.E. Dinger, Long noncoding RNAs and the genetics of cancer, *Br. J. Cancer* 108 (2013) 2419–2425.
- G. Yang, X. Lu, L. Yuan, LncRNA: a link between RNA and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1839 (2014) 1097–1109.
- M. Huarte, The emerging role of lncRNAs in cancer, *Nat. Med.* 21 (2015) 1253–1261.
- H. Choudhry, J. Schodel, S. Oikonomopoulos, C. Camps, S. Grampp, A.L. Harris, P.J. Ratcliffe, J. Ragoussis, D.R. Mole, Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2, *EMBO Rep.* 15 (2014) 70–76.
- A. Lin, C. Li, Z. Xing, Q. Hu, K. Liang, L. Han, C. Wang, D.H. Hawke, S. Wang, Y. Zhang, Y. Wei, G. Ma, P.K. Park, J. Zhou, Y. Zhou, Z. Hu, Y. Zhou, J.R. Marks, H. Liang, M.C. Hung, C. Lin, L. Yang, The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 $\alpha$  signalling in triple-negative breast cancer, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016) 213–224.
- P. Koirala, J. Huang, T.T. Ho, F. Wu, X. Ding, Y.Y. Mo, LncRNA AK023948 is a positive regulator of AKT, *Nat. Commun.* 8 (2017) 14422.
- Y. Zhuang, X. Wang, H.T. Nguyen, Y. Zhuo, X. Cui, C. Fowell, E.K. Flemington, B. Shan, Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen, *J. Hematol. Oncol.* 6 (2013) 35.
- K. Wu, Z. Zhao, K. Liu, J. Zhang, G. Li, L. Wang, Long noncoding RNA lnc-sox5 modulates CRC tumorigenesis by unbalancing tumor microenvironment, *Cell Cycle* (2017) 1–7.
- X. Wang, W. Sun, W. Shen, M. Xia, C. Chen, D. Xiang, B. Ning, X. Cui, H. Li, X. Li, J. Ding, H. Wang, Long non-coding RNA DILC regulates liver cancer stem cells via IL-6/STAT3 axis, *J. Hepatol.* 64 (2016) 1283–1294.
- M. Zhou, Y. Hou, G. Yang, H. Zhang, G. Tu, Y.E. Du, S. Wen, L. Xu, X. Tang, S. Tang, L. Yang, X. Cui, M. Liu, LncRNA-Hh strengthen cancer stem cells generation in twist-positive breast cancer via activation of hedgehog signaling pathway, *Stem Cells* 34 (2016) 55–66.
- R. Pacheco-Marin, J. Melendez-Zajgla, G. Castillo-Rojas, E. Mandujano-Tinoco, A. Garcia-Venzor, S. Uribe-Carvajal, A. Cabrera-Orefice, C. Gonzalez-Torres, J. Gaytan-Cervantes, I.B. Mitre-Aguilar, V. Maldonado, Transcriptome profile of the early stages of breast cancer tumoral spheroids, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23373.
- T. Horn, M. Boutros, E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents—2010 update, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) W332–W339.
- S. Roy, D. Patel, S. Khanna, G.M. Gordillo, S. Biswas, A. Friedman, C.K. Sen, Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human skin and chronic wound-edge tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 14472–14477.
- A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics* 29 (2013) 15–21.
- M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth, edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics* 26 (2010) 139–140.
- A. Kramer, J. Green, J. Pollard, S. Tugendreich, Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis, *Bioinformatics* 30 (2014) 523–530.
- K. Vazquez-Santillan, J. Melendez-Zajgla, L.E. Jimenez-Hernandez, J. Gaytan-Cervantes, L. Muñoz-Galindo, P. Pina-Sanchez, G. Martinez-Ruiz, J. Torres, P. Garcia-Lopez, C. Gonzalez-Torres, V. Ruiz, F. Avila-Moreno, M. Velasco-Velazquez, M. Perez-Tapia, V. Maldonado, NF-kappaB $\alpha$ -inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37340.
- K.E. Varley, J. Gertz, B.S. Roberts, N.S. Davis, K.M. Bowling, M.K. Kirby, A.S. Nesmith, P.G. Oliver, W.E. Grizzle, A. Forero, D.J. Buchsbaum, A.F. LoBuglio, R.M. Myers, Recurrent read-through fusion transcripts in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 146 (2014) 287–297.
- B. Li, C.N. Dewey, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome, *BMC Bioinformatics* 12 (2011) 323.
- N. Leng, J.A. Dawson, J.A. Thomson, V. Ruotti, A.I. Rissman, B.M. Smits, J.D. Haag, M.N. Gould, R.M. Stewart, C. Kendziorzi, EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments, *Bioinformatics* 29 (2013) 1035–1043.
- Y. Hu, G.K. Smyth, ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays, *J. Immunol. Methods* 347 (2009) 70–78.
- J.J. Quinn, H.Y. Chang, In situ dissection of RNA functional subunits by domain-specific chromatin isolation by RNA purification (dChIRP), in: S. Nakagawa, T. Hirose (Eds.), *Nuclear Bodies and Noncoding RNAs: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2015, pp. 199–213.
- L.B. Weiswald, D. Bellet, V. Dangles-Marie, Spherical cancer models in tumor biology, *Neoplasia* 17 (2015) 1–15.
- C. Xie, J. Yuan, H. Li, M. Li, G. Zhao, D. Bu, W. Zhu, W. Wu, R. Chen, Y. Zhao, NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D98–103.
- O. Ram, A. Goren, I. Amit, N. Shores, N. Yosef, J. Ernst, M. Kellis, M. Gymrek, R. Issner, M. Coyne, T. Durham, X. Zhang, J. Donaghey, C.B. Epstein, A. Regev, B.E. Bernstein, Combinatorial patterning of chromatin regulators uncovered by genome-wide location analysis in human cells, *Cell* 147 (2011) 1628–1639.
- M. Hou, X. Tang, F. Tian, F. Shi, F. Liu, G. Gao, AnnoLnc: a web server for systematically annotating novel human lncRNAs, *BMC Genomics* 17 (2016) 931.
- M.J. Tindall, L. Dyson, K. Smallbone, P.K. Maini, Modelling acidosis and the cell cycle in multicellular tumour spheroids, *J. Theor. Biol.* 298 (2012) 107–115.
- X. Messegue, R. Escudero, D. Farre, O. Nunez, J. Martinez, M.M. Alba, PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches, *Bioinformatics* 18 (2002) 333–334.
- N.J. Majeesh, D. Escuin, T.M. LaVallee, V.S. Pribluda, G.M. Swartz, M.S. Johnson, M.T. Willard, H. Zhong, J.W. Simons, P. Giannakakou, 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF, *Cancer Cell* 3 (2003) 363–375.
- N. Rohwer, S. Lobitz, K. Daskalov, T. Jons, M. Vieth, P.M. Schlag, W. Kemmer, B. Wiedenmann, T. Cramer, M. Hocker, HIF-1 $\alpha$  determines the metastatic potential of gastric cancer cells, *Br. J. Cancer* 100 (2009) 772–781.
- E.P. Cummins, C.T. Taylor, Hypoxia-responsive transcription factors, *Pflugers Arch.* 450 (2005) 363–371.
- J.W. Wojtkowiak, D. Verduzco, K.J. Schramm, R.J. Gillies, Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 2032–2038.
- J.C. Gallardo-Perez, M. Espinosa, G. Ceballos-Cancino, A. Daniel, S. Rodriguez-Enriquez, A. Aviles, R. Moreno-Sanchez, J. Melendez-Zajgla, V. Maldonado, NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids, *J. Cell. Biochem.* 108 (2009) 169–180.
- T. Oki, K. Nishimura, J. Kitaura, K. Togami, A. Maehara, K. Izawa, A. Sakaue-Sawano, A. Naida, S. Miyano, H. Aburatani, H. Kiyonari, A. Miyawaki, T. Kitamura, A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K<sup>1</sup>, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition, *Sci. Rep.* 4 (2014) 4012.
- E. Endl, I. Kausch, M. Baack, R. Knippers, J. Gerdes, T. Scholzen, The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells, *J. Pathol.* 195 (2001) 457–462.
- E.A. Mandujano-Tinoco, J.C. Gallardo-Perez, A. Marin-Hernandez, R. Moreno-Sanchez, S. Rodriguez-Enriquez, Anti-mitochondrial therapy in human breast

- cancer multi-cellular spheroids, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 541–551.
- [42] R.B. Clarke, A. Howell, C.S. Potten, E. Anderson, P27(KIP1) expression indicates that steroid receptor-positive cells are a non-proliferating, differentiated sub-population of the normal human breast epithelium, *Eur. J. Cancer* 36 (Suppl. 4) (2000) S28–S29.
- [43] S. Kumar, A. Kapoor, S. Desai, M.M. Inamdar, S. Sen, Proteolytic and non-proteolytic regulation of collective cell invasion: tuning by ECM density and organization, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19905.
- [44] L. Wu, Q. Xu, H. Zhang, M. Li, C. Zhu, M. Jiang, X. Sang, Y. Zhao, Q. Sun, H. Zhao, A new avenue for obtaining insight into the functional characteristics of long non-coding RNAs associated with estrogen receptor signaling, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31716.
- [45] M. Gandhari, N. Arens, M. Majety, A. Dorn-Beineke, R. Hildenbrand, Urokinase-type plasminogen activator induces proliferation in breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 28 (2006) 1463–1470.
- [46] P. Ji, Y. Zhang, S.J. Wang, H.L. Ge, G.P. Zhao, Y.C. Xu, Y. Wang, CD44hiCD24lo mammosphere-forming cells from primary breast cancer display resistance to multiple chemotherapeutic drugs, *Oncol. Rep.* 35 (2016) 3293–3302.
- [47] X. Jiao, A.A. Rizvanov, M. Cristofanilli, R.R. Miftakhova, R.G. Pestell, Breast Cancer stem cell isolation, *Methods Mol. Biol.* 1406 (2016) 121–135.
- [48] Y.C.A. Schwarz-Cruz, M. Espinosa, V. Maldonado, J. Melendez-Zajgla, Advances in the knowledge of breast cancer stem cells. A review, *Histol. Histopathol.* 31 (2016) 601–612.
- [49] L. Li, C.F. Bellows, Doublecortin-like kinase 1 exhibits cancer stem cell-like characteristics in a human colon cancer cell line, *Chin. J. Cancer Res.* 25 (2013) 134–142.
- [50] H. Fan, P. Lv, X. Huo, J. Wu, Q. Wang, L. Cheng, Y. Liu, Q.Q. Tang, L. Zhang, F. Zhang, X. Zheng, H. Wu, B. Wen, The nuclear matrix protein HNRNP1 maintains 3D genome architecture globally in mouse hepatocytes, *Genome Res.* 28 (2018) 192–202.
- [51] A.S. Ma, K. Moran-Jones, J. Shan, T.P. Munro, M.J. Snee, K.S. Hoek, R. Smith, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18010–18020.
- [52] A. Castellanos-Rubio, N. Fernandez-Jimenez, R. Kratchmarov, X. Luo, G. Bhagat, P.H. Green, R. Schneider, M. Kiledjian, J.R. Bilbao, S. Ghosh, A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease, *Science* 352 (2016) 91–95.
- [53] F.V. Fuller-Pace, S. Ali, The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators, *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 609–612.
- [54] J.E. Dahlberg, E. Lund, Functions of the GTPase ran in RNA export from the nucleus, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 400–408.
- [55] P.C. McDonald, S.C. Chafe, S. Dedhar, Overcoming hypoxia-mediated tumor progression: combinatorial approaches targeting pH regulation, angiogenesis and immune dysfunction, *Front Cell Dev Biol* 4 (2016) 27.
- [56] O.V. Leontieva, V. Natarajan, Z.N. Demidenko, L.G. Burdelya, A.V. Gudkov, M.V. Blagosklonny, Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 13314–13318.
- [57] M. Mourtada-Maarabouni, V.L. Hedge, L. Kirkham, F. Farzaneh, G.T. Williams, Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5), *J. Cell Sci.* 121 (2008) 939–946.
- [58] A. Renganathan, J. Kresoja-Rakic, N. Echeverry, G. Ziltener, B. Vrugt, I. Opitz, R.A. Stabel, E. Felley-Bosco, GAS5 long non-coding RNA in malignant pleural mesothelioma, *Mol. Cancer* 13 (2014) 119.
- [59] F. Yang, H. Zhang, Y. Mei, M. Wu, Reciprocal regulation of HIF-1 $\alpha$  and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect, *Mol. Cell* 53 (2014) 88–100.
- [60] J. Wang, X. Liu, Z. Jiang, L. Li, Z. Cui, Y. Gao, D. Kong, X. Liu, A novel method to limit breast cancer stem cells in states of quiescence, proliferation or differentiation: use of gel stress in combination with stem cell growth factors, *Oncol. Lett.* 12 (2016) 1355–1360.
- [61] L. Xiang, D.M. Gilkes, P. Chaturvedi, W. Luo, H. Hu, N. Takano, H. Liang, G.L. Semenza, Ganetespib blocks HIF-1 activity and inhibits tumor growth, vascularization, stem cell maintenance, invasion, and metastasis in orthotopic mouse models of triple-negative breast cancer, *J Mol Med (Berl)* 92 (2014) 151–164.
- [62] A. Shiraiishi, K. Tachi, N. Essid, I. Tsuboi, M. Nagano, T. Kato, T. Yamashita, H. Bando, H. Hara, O. Ohneda, Hypoxia promotes the phenotypic change of aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells, *Cancer Sci.* 108 (2017) 362–372.
- [63] W. Chen, J. Dong, J. Haiech, M.C. Kilhoffer, M. Zeniou, Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 1740936.
- [64] K. Talkenberger, E.A. Cavalcanti-Adam, A. Voss-Bohme, A. Deutsch, Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9237.
- [65] Z. An, B. Akily, M. Sabalic, G. Zong, Y. Chai, P.T. Sharpe, Regulation of mesenchymal stem to transit-amplifying cell transition in the continuously growing mouse incisor, *Cell Rep.* 23 (2018) 3102–3111.
- [66] T.R. Mercer, J.S. Mattick, Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013) 300–307.
- [67] L. Millan-Arino, A.B. Islam, A. Izquierdo-Bouldstridge, R. Mayor, J.M. Terme, N. Luque, M. Sancho, N. Lopez-Bigas, A. Jordan, Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 4474–4493.
- [68] E. Hacisuleyman, L.A. Goff, C. Trapnell, A. Williams, J. Henao-Mejia, L. Sun, P. McClanahan, D.G. Hendrickson, M. Sauvageau, D.R. Kelley, M. Morse, J. Engreitz, E.S. Lander, M. Guttman, H.F. Lodish, R. Flavell, A. Raj, J.L. Rinn, Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 198–206.
- [69] L. Mi, X.Y. Zhao, S. Li, G. Yang, J.D. Lin, Conserved function of the long noncoding RNA Blncl in brown adipocyte differentiation, *Mol Metab* 6 (2017) 101–110.
- [70] P.K. Puvvula, R.D. Desetty, P. Pineau, A. Marchio, A. Moon, A. Dejean, O. Bischof, Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5323.
- [71] G. Giraud, S. Terrone, C.F. Bourgeois, Functions of DEAD box RNA helicases DDX5 and DDX17 in chromatin organization and transcriptional regulation, *BMB Rep.* 51 (12) (2018) 613–622.
- [72] C. Liu, H.T. Wu, N. Zhu, Y.N. Shi, Z. Liu, B.X. Ao, D.F. Liao, X.L. Zheng, L. Qin, Steroid receptor RNA activator: biologic function and role in disease, *Clin. Chim. Acta* 459 (2016) 137–146.
- [73] C. Jung, G. Mittler, F. Oswald, T. Borggrefe, RNA helicase Ddx5 and the noncoding RNA SRA act as coactivators in the Notch signaling pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 1180–1189.
- [74] T. Sallam, M. Jones, B.J. Thomas, X. Wu, T. Gilliland, K. Qian, A. Eskin, D. Casero, Z. Zhang, J. Sandhu, D. Salisbury, P. Rajbhandari, M. Civelek, C. Hong, A. Ito, X. Liu, B. Daniel, A.J. Lusis, J. Whitelegge, L. Nagy, A. Castrillo, S. Smale, P. Tontonoz, Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA, *Nat. Med.* 24 (2018) 304–312.
- [75] M.O. Idowu, M. Kmiecik, C. Dumur, R.S. Burton, M.M. Grimes, C.N. Powers, M.H. Manjili, CD44(+)/CD24(–/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome, *Hum. Pathol.* 43 (2012) 364–373.