



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**Validación funcional *in vitro* de un ARN exosomal en la
quimiorresistencia del cáncer de mama**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
C. EVA MARIA GINEZ MENESES

DIRECTOR:
DRA. SANDRA LORENA ROMERO CORDOBA

CO-DIRECTOR:
DR. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

Enero de 2023.



Resumen.

El cáncer de mama triple negativo ocurre en el 12% al 20% del total de pacientes diagnosticados con cáncer de mama, se caracteriza por carecer de la expresión del receptor de estrógenos, progesterona, y del factor de crecimiento epidérmico-2. Este subtipo tumoral, presenta un comportamiento clínico agresivo y un peor pronóstico en comparación con los otros fenotipos del cáncer de mama, y la quimioterapia permanece como la única opción de tratamiento, lo cual dificulta su manejo. Aunado a ello, la quimiorresistencia constituye una de las principales barreras en el éxito del tratamiento contra el cáncer de mama triple negativo, se ha descrito que los exosomas liberados por células tumorales pueden influir en la respuesta a agentes quimioterapéuticos, debido a su capacidad de transportar moléculas bioactivas, entre ellas, ARNs. En este trabajo, se plantea la posible actividad de la serina proteasa de transmembrana 4 (TMPRSS4) sobre la resistencia a terapia en modelos *in vitro* de cáncer de mama triple negativo y se sienta las bases para el estudio sobre la utilidad clínica de este ARN exosomal para predecir la respuesta a la quimioterapia en pacientes.

Agradecimientos.

Agradezco a la dra. Sandra Lorena Romero Cordoba, por brindarme un espacio en su laboratorio y por su paciencia durante toda la estancia.

Así mismo, agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM, por brindar el financiamiento para la realización de este proyecto (“Mecanismo de acción e importancia clínica de los exosomas y ARNs exosomales en la quimiorresistencia del cáncer de mama triple negativo” IA206422)

Índice

Introducción.....	4
¿Qué es el cáncer? _____	4
Rasgos distintivos del cáncer: “ <i>Hallmarks del cáncer</i> ” _____	5
Cáncer de mama: una entidad patológica heterogénea _____	11
Epidemiología del cáncer de mama _____	12
Subtipos clínicos de cáncer de mama _____	13
Cáncer de mama triple negativo: un reto clínico y biológico _____	16
Tratamiento actual para los tumores de cáncer de mama triple negativo _____	18
Cáncer de mama triple negativo en etapas tempranas _____	19
Retos en el tratamiento y diagnóstico de cáncer de mama triple negativo _____	25
Mecanismos de resistencia de fármacos que favorecen la limitada respuesta a tratamiento en cáncer _____	27
Comunicación celular _____	30
Exosomas como vía de intercambio de mensajes moleculares _____	31
Contenido molecular exosomal _____	32
Importancia de los exosomas en cáncer de mama. _____	33
Participación de los exosomas en la resistencia a fármacos _____	34
Antecedentes directos: una exploración funcional y transcriptómica que identificó ARNs exosomales asociados a la quimiorresistencia en modelos <i>in</i> <i>vitro</i> y muestras humanas de tumores _____	35
TMPRSS4: Un cargo exosomal relevante con posible impacto en la resistencia a quimioterapia en cáncer de mama triple negativo _____	36
Justificación _____	38
Hipótesis _____	40
Objetivos	40
Metodología	40
Resultados	48
Discusión _____	52
Conclusión _____	55
Bibliografía.....	56

Introducción.

¿Qué es el cáncer?

El cáncer es un término acuñado para englobar a un grupo de diversas enfermedades con un origen genético/genómico. El proceso que desencadena el cáncer es conocido como carcinogénesis y se caracteriza por la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en genes importantes para el control del crecimiento, división celular y la diseminación a otros órganos y tejidos, entre otras características descritas como rasgos de identidad del cáncer (Hanahan, 2022) estos cambios, pueden conferir a las células la capacidad de proliferar y sobrevivir con mayor eficacia que las células vecinas, y ocasionalmente, las células adquirirán la capacidad de invadir tejidos y hacer metástasis (Stefanius, Servage, & Orth, 2021; Stratton, Campbell, & Futreal, 2009). Este proceso se lleva a cabo en tres etapas principales: inicio, promoción y progresión. De forma relevante, las células tumorales conviven y pueden influir en las células, en el microambiente que las rodea como poblaciones inmunes, fibroblastos, adipocitos y células nerviosas.

Los cambios genéticos, son llamados mutaciones y pueden ser de la línea germinal, es decir, que se transmiten de manera hereditaria o somáticas, que son aquellas que ocurren durante el desarrollo de la vida de una persona, este tipo de mutaciones incluyen sustituciones de bases nitrogenadas, inserciones, deleciones, reordenamientos y cambio en el número de copias, la mayor parte de estos cambios se reparan, sin embargo, una pequeña fracción puede convertirse en mutaciones. Las tasas de mutación aumentan en presencia de mutágenos tales como sustancias químicas o radiación, además, la célula cancerosa, puede haber adquirido secuencias de ADN de fuentes exógenas, particularmente, de virus oncogénicos, como el del papiloma humano. Los cambios epigenéticos también son relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer, estos involucran la alteración de la estructura de la cromatina y la metilación del ADN (Stratton *et al.*, 2009).

El cáncer es una enfermedad altamente heterogénea, existen más de 100 tipos que reciben el nombre de los órganos o tejidos donde se forman, también suelen

describir el tipo de célula que los forma, y de cada tipo surgen subtipos dependiendo de las características moleculares que presentan las células.

Rasgos distintivos del cáncer: “*Hallmarks del cáncer*”

El cáncer, al tratarse de un padecimiento muy heterogéneo, nos enfrenta a la necesidad de conocer las características únicas que hacen que una célula normal pase a ser una célula cancerígena. En el 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg, describen los *hallmarks* del cáncer, como las capacidades biológicas que adquiere una célula durante el desarrollo y la progresión del cáncer y que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse a otros órganos.

¿Cómo una célula tumoral mantiene la señalización proliferativa? Las células en condiciones normales requieren señales externas para que se dé la proliferación y así, la división celular se mantiene controlada, sin embargo, las células tumorales poseen oncogenes codificantes para proteínas, las cuales imitan esta señalización y en consecuencia las células generan sus propias señales proliferativas, adquiriendo la habilidad de sobre expresar o alterar los receptores celulares para impulsar la producción de señales de crecimiento en células adyacentes. Por ello su tasa de proliferación es mayor a la del tejido normal de origen (Weinberg, 1995).

¿Cómo una célula tumoral elude los supresores de crecimiento? Las señales anti proliferativas mantienen la homeostasis del tejido y por lo tanto la división de las células se encuentra restringida por estas señales, que son recibidas por receptores transmembranales presentes en la superficie celular, las células tumorales deben evadir estas señales para proliferar de forma desregulada, produciendo ligandos de factores de crecimiento por sí mismas, a los que pueden responder a través de la expresión de sus receptores, lo que da como resultado una estimulación proliferativa autocrina. Estos mismos mecanismos pueden estimular a las células normales dentro del estroma, que corresponde al suministro de factores de crecimiento a las células cancerosas, o bien, elevando los niveles de proteínas receptoras en la superficie de células cancerosas, lo que hace que esas células sean hipersensibles

a cantidades limitantes de ligando del factor de crecimiento (Witsch, Sela, & Yarden, 2010).

¿Cómo una célula tumoral resiste la muerte celular? Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o elucidar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función del gen supresor tumoral codificante para la proteína reguladora P53, que se encuentra en el núcleo celular y cumple una función importante en el control de la división celular y la destrucción de las mismas (Butt, Firth, & Baxter, 1999).

¿Cómo una célula tumoral activa la invasión y metástasis? Durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer humano, las masas tumorales primarias generan células pioneras que se desplazan, invaden los tejidos adyacentes y desde allí viajan a sitios distantes donde pueden tener éxito en la fundación de nuevas colonias. A medida que los carcinomas progresan a grados patológicos más altos, las células cancerosas desarrollan alteraciones en su forma y en su unión a otras células y a la matriz extracelular, que da lugar a la invasión local y la metástasis a distancia. Para ello, se alteran varias clases de proteínas implicadas en la unión de las células al tejido, entre las proteínas afectadas, se incluyen las moléculas de adhesión célula a célula (CAM), en particular miembros de las familias de inmunoglobulinas y cadherinas dependientes de calcio. Otra proteína ampliamente relacionada con este proceso, es la E-Cadherina, una molécula que permite el acoplamiento célula-célula, su función se pierde en la mayoría de cánceres epiteliales por inactivación mutacional, represión transcripcional o proteólisis del dominio extracelular (Christofori & Semb, 1999).

¿Cómo una célula tumoral adquiere la inmortalidad replicativa? Las células cancerosas requieren un potencial replicativo ilimitado para la generación de los tumores macroscópicos. Esta capacidad contrasta con el comportamiento de las células en la mayoría de linajes celulares normales del organismo que pueden dividirse un número limitado de veces (Hayflick, 1998).

Las dos barreras de la proliferación celular son la senescencia y apoptosis, las cuales se han racionalizado como defensas anticancerígenas cruciales. La inmortalización de células que proceden a formar tumores se ha atribuido a su capacidad para mantener el ADN telomérico en longitudes suficientes para evitar desencadenar la senescencia o apoptosis, lo cual logran mediante la regulación al alza de la expresión de la telomerasa (ADN polimerasa, encargada de agregar ADN telomérico a los extremos de los cromosomas) o a través de un mecanismo de mantenimiento de los telómeros basado en la recombinación (Bergers, Hanahan, & Coussens, 1998).

¿Cómo una célula tumoral induce la angiogénesis? Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono, para ello las células favorecen la generación de vasos sanguíneos. En el contexto del cáncer los bajos niveles de oxígeno (hipoxia) provocan que el tumor libere señales que resultan en el crecimiento de vasos sanguíneos y con ello en satisfacer las necesidades previamente descritas (Baeriswyl & Christofori, 2009).

La forma en que los tumores inducen la angiogénesis es alterando el balance de inductores e inhibidores angiogénicos a través de la alteración del transcriptoma, se ha descrito la sobreexpresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en tejidos tumorales y la regulación a la baja de inhibidores como trombospondina-1 o interferón β (Baeriswyl & Christofori, 2009).

Con la revolución del conocimiento oncológico acontecida en la primera década de este milenio, en 2011 Hanahan & Weinberg describen otras características “emergentes” involucradas en la patogénesis del cáncer:

- La desregulación del metabolismo celular que implica la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo de la célula tumoral y del microambiente que la acompaña para apoyar la proliferación neoplásica de manera eficaz. El crecimiento y la división celular descontrolada, requiere que las células ajusten su metabolismo energético, incluso en presencia de

oxígeno, pueden reprogramar su metabolismo de glucosa, limitando su metabolismo a lo que se conoce como “glucólisis aeróbica”, lo logran regulando a la alza los transportadores de glucosa, en particular, GLUT1 lo que aumenta la importación de glucosa al citoplasma. Curiosamente, se ha descubierto que algunos tumores contienen dos subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus vías de generación de energía. Una subpoblación consta de células dependientes de la glucosa (“efecto *Warburg*”) que secretan lactato, mientras que las células de la segunda subpoblación importan y utilizan preferentemente el lactato como su principal fuente de energía, empleando parte del ciclo del ácido cítrico (R. G. Jones & Thompson, 2009; Kennedy & Dewhirst, 2010).

- La evasión de la respuesta inmune, permitiendo que las células cancerosas eludan la actividad inmunológica antitumoral. Las células cancerosas tienen la capacidad de evadir la destrucción inmunológica al inhabilitar componentes del sistema inmune, por ejemplo, pueden paralizar a las células NK al secretar el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) u otros factores inmunosupresores. Otro mecanismo, involucra el reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresoras con el fin de suprimir la acción de los linfocitos citotóxicos (R. Jones & Zweier, 2014; Shields, Kourtis, Tomei, Roberts, & Swartz, 2010).

Así mismo, Hanahan & Weinberg discutieron las "características habilitadoras" que ocurren como consecuencia de la condición aberrante de la neoplasia y proporcionan a los tumores medios para adoptar dichas características oncogénicas. La inestabilidad genómica, que genera mutaciones “aleatorias”, brinda a las células cancerosas alteraciones genéticas que impulsan la progresión del tumor; la adquisición de las características de las células tumorales, depende en gran parte de alteraciones en sus genomas, ciertos genotipos mutantes, confieren una ventaja selectiva a subclonas celulares, lo cual permite que crezcan y dominen el entorno tisular local, esto también suele estar influenciado por mecanismos epigenéticos como son la metilación del ADN y las modificaciones a histonas

(Berdasco & Esteller, 2010). La inflamación establecida por las células inmunes innatas puede resultar benéfica para el desarrollo y progresión del tumor; algunos tumores se encuentran altamente infiltrados por células del sistema inmune innato y adaptativo, por lo tanto, reflejan condiciones inflamatorias, esta condición, puede contribuir a la adquisición de las capacidades distintivas a través del suministro de moléculas bioactivas al microambiente, como factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos y enzimas modificadoras de la matriz extracelular, además, las células inflamatorias pueden liberar sustancias químicas mutagénicas, lo que acelera la evolución genética de las células cancerosas (DeNardo, Andreu, & Coussens, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Finalmente, esta fina descripción de las células del cáncer ha sido complementada en 2022, incluyendo nuevas características emergentes y habilitadoras.

Las características emergentes recientemente discutidas por Hanahan son: la plasticidad fenotípica y la senescencia celular. El resultado de la diferenciación celular tiene como resultado, en la mayoría de los casos, un efecto anti proliferativo y constituye una barrera para la proliferación continua que se observa en las neoplasias. De este modo un componente relevante de la patogénesis del cáncer es la pérdida del bloqueo de la plasticidad fenotípica para evadir o escapar del estado de diferenciación terminal, las células neoplásicas pueden entonces interrumpir el proceso de diferenciación, con el fin de mantenerse en expansión en un estado similar al de una célula progenitora (Yuan, Norgard, & Stanger, 2019). Otro mecanismo es la dediferenciación de estados maduros a estados progenitores, alternativamente, se ha observado la presencia de procesos de transdiferenciación, en la que las células que entran en un programa de diferenciación hacia otro linaje celular (Saghafinia *et al.*, 2021). Por otro lado, la senescencia celular es una forma limitada de la proliferación, que permite mantener la homeostasis tisular, este estado celular, evoca cambios en la morfología, el metabolismo y la activación de un fenotipo secretor asociado a la senescencia que implica la liberación de proteínas bioactivas. Este mecanismo ha sido contradictorio pues por un lado se ha descrito como un proceso protector contra la neoplasia,

pero en ciertos contextos las células senescentes estimulan el desarrollo tumoral y la progresión maligna, principalmente a través del fenotipo secretor, pues las sustancias que liberan las células senescentes producen inflamación y contribuyen a la señalización proliferativa, otro mecanismo implica estados de células senescentes transitorios y reversibles mediante el cual, las células cancerosas pueden reanudar su proliferación celular (De Blander, Morel, Senaratne, Ouzounova, & Puisieux, 2021; Hanahan, 2022).

Otra de las características habilitadoras, descritas en esta última perspectiva de Hanahan es la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos. La inestabilidad y mutación del genoma es un componente fundamental en la formación y patogénesis del cáncer, sin embargo, la regulación epigenética, que no involucra mutaciones, también contribuye a la reprogramación genética y con ello a la adquisición de capacidades durante el desarrollo y progresión tumoral. Por otro lado, los microbiomas tienen un gran impacto en el proceso salud-enfermedad, y cada vez crece más la evidencia de que la variabilidad polimórfica en los microbiomas entre los individuos de una población pueden tener un impacto en los fenotipos del cáncer (Flavahan, Gaskell, & Bernstein, 2017; Hanahan, 2022). La figura 1 resume las capacidades biológicas que adquiere una célula durante el desarrollo y la progresión del cáncer.



Figura 1. Hallmarks del cáncer. Este esquema muestra las capacidades adquiridas durante el desarrollo y la progresión tumoral. Imagen tomada y adaptada de Hanahan,2022.

Cáncer de mama: una entidad patológica heterogénea

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de las células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tienen la capacidad para diseminarse de forma local a los ganglios linfáticos y de forma sistémica a otros órganos (National Institute of Cancer, 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS), lo reconoce como el tipo de cáncer más común en el mundo. Este padecimiento es de origen multifactorial y entre los factores de riesgo del cáncer de mama se encuentran los antecedentes familiares, la presencia de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 u otros genes que se emplean como marcadores de este padecimiento, presentar tejido mamario denso, menarca a temprana edad, menopausia a edad tardía, obesidad, alcoholismo y tabaquismo, así mismo, la edad avanzada también es un importante factor de riesgo (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019; CENETEC, 2012).

Los genes relacionados con el cáncer hereditario de mama pueden dividirse en los que confieren alta susceptibilidad para el desarrollo de cáncer (mayor de 50 %)

(BRCA1, BRCA2, CDH1, NF1, PTEN, TP53 y STK11) y moderada susceptibilidad (20 a 50 %) (ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD51D y NBS1) (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

Los signos y síntomas característicos del cáncer de mama incluyen, una masa dura en la mama o axila, normalmente indolora y de un solo lado, alteraciones en la piel como hoyuelos, arrugas o enrojecimiento, cambios en el tamaño o forma de la mama, hundimiento del pezón, secreciones del pezón y presencia de bultos. El diagnóstico puede realizarse a partir de un examen físico, un examen clínico, mamografía, imágenes por resonancia magnética y ultrasonido y biopsia (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

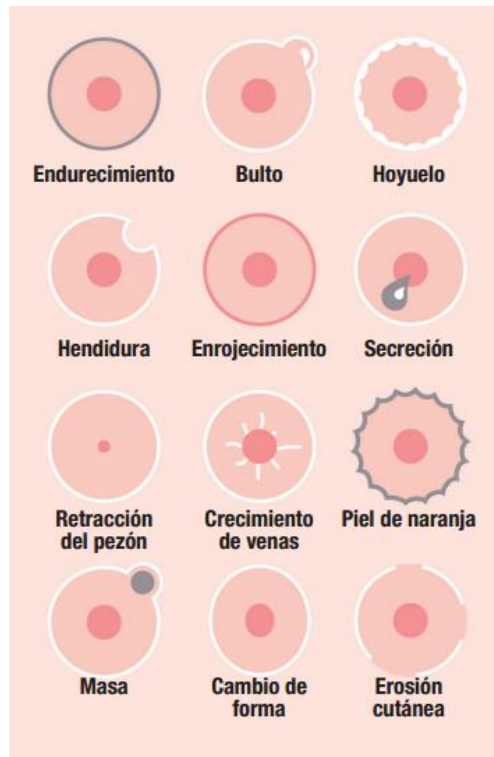


Figura 2. Signos y síntomas comunes del cáncer de mama. Obtenido de: <https://rochepacientes.es/cancer/mama/sintomas.html>

Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las principales afecciones de salud a nivel mundial, particularmente en México es el tipo de tumor maligno más frecuente en mujeres (INEGI, 2020). Así mismo, se trata de la principal causa de muerte por cáncer en

mujeres de entre de 20 a 59 años (Banerji *et al.*, 2012; Lakshmi, Hughes, & Priya, 2021).

A nivel mundial cada año se registran 685 mil defunciones por cáncer de mama, representando uno de los principales tumores malignos y una de las primeras causas de muerte en mujeres. En México, el cáncer de mama ha tenido un incremento constante, tanto en su incidencia como en su mortalidad, algunas razones que pueden justificar este hecho es el aumento de la población de mujeres de 35 a 54 años, los cambios socioculturales, ambientales y la predisposición genética a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 ligados a este padecimiento (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019; INEGI, 2020). En 2020, en México, fallecieron 97,323 personas por tumores malignos, de los cuales 7,880 fueron por tumores malignos de mama, lo cual representa el 8% del total de los casos (INEGI, 2021).

La tasa de mortalidad se incrementa con el rango de edad. Son pocas las mujeres jóvenes de entre 20 a 29 años que mueren por cáncer de mama (0.64 defunciones por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad), seguidas por el grupo etario de 30 a 44 con una tasa de 7.09 defunciones por cada 100 mil. Las tasas más altas se registran en los grupos de 45 a 59 años y de 60 años o más (26.79 y 49.08 defunciones de mujeres por cada 100 mil mujeres, respectivamente) (INEGI, 2021). Existe evidencia de que, en nuestro país, los retrasos en los tratamientos de las pacientes con cáncer de mama son frecuentes y se asocian con presentaciones en estados clínicos más avanzados, por ello se requiere un manejo óptimo en la etapa temprana (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

Subtipos clínicos de cáncer de mama

Los carcinomas de mama representan un grupo muy heterogéneo de tumores, por lo que inicialmente, se clasificaron en base a su histología, a partir de la cual, el tumor se describía en base a la apariencia de las células y los tejidos al microscopio y qué tan rápido podrían multiplicarse y diseminarse, sin embargo, dicha clasificación, no refleja su heterogeneidad molecular, ni permite predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento o detectar marcadores para brindar terapias dirigidas (Harbeck *et al.*, 2019).

Actualmente, en la práctica clínica se utiliza una clasificación de cinco subtipos en base a las características histológicas y moleculares principalmente a través de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos de los receptores de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Tabla 1) (Harbeck *et al.*, 2019). Con base en la positividad y expresión de estos receptores los tumores de mama se clasifican en los siguientes subgrupos:

El tipo luminal que se caracteriza por presentar receptores hormonales positivos (RE y RP), los pacientes con este fenotipo reciben terapia endócrina dirigida, se considera el tipo más heterogéneo en términos de expresión genética, espectro de mutaciones y cambios en el número de copias (Koboldt *et al.*, 2012). Este subtipo puede subclasificarse en:

- **Luminal A:** En este subtipo, los receptores hormonales están altamente expresados, muestra bajas tasas de proliferación, típicamente de bajo grado, bajo índice Ki67, un marcador ampliamente utilizado para determinar la proliferación y predice la quimiosensibilidad de las células, por lo que tienen un buen pronóstico, es el subtipo más común.
- **Luminal B HER2+:** Se expresan ambos receptores de estrógenos, pero en menor grado que el subtipo luminal A, son HER2+, es de grado superior y posee alto índice Ki67, responde a terapias dirigidas y el pronóstico de las pacientes diagnosticadas con este tipo tumoral es intermedio.
- **Luminal B HER2-:** Se expresan ambos receptores de estrógenos, pero en menor grado que el subtipo luminal A, son HER2-, es de grado superior y posee alto índice Ki67, responde a terapias dirigidas y su pronóstico es intermedio.

Los tumores **HER-2+** suelen ser neoplasias de alto grado, alto índice de Ki-67, enfermedad agresiva, pero responden a terapias dirigidas anti-HER2 y poseen un pronóstico intermedio.

Finalmente, los **tumores triple negativos** se caracterizan por carecer de la expresión del receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER2). Las células de este subtipo poseen una proliferación alta, pues presentan un alto índice Ki67. Se consideran tumores de alto grado y en general tienen un mal pronóstico. El cáncer de mama triple negativo tiene una mayor incidencia en pacientes con mutaciones de la línea germinal BRCA1 o de ascendencia africana (Harbeck *et al.*, 2019).

En población mexicana, la frecuencia promedio de subgrupos definido por estos marcadores es la siguiente: receptores hormonales positivo 60 %, HER-2 positivos 20.4 % y triples negativos 23.1 % (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

Tabla 1. Subtipos moleculares del cáncer de mama y su aproximación por inmunohistoquímica, de acuerdo con el Consenso de Colima 2021.

Subtipo	Aproximación por inmunohistoquímica
Luminal A	RE +, RP>20%, Ki67<20% GH 1 o 2, HER-2 -
Luminal B	(HER-2 -)
	RE +, RP<20%, Ki67>20% GH 3
	(HER-2+)
	RE +, RP<20%, Ki67>20% GH
HER-2	RE -, RP -, HER-2 +
Triple negativo	RE -, RP - HER-2 -

GH: grado histológico

Gracias al análisis molecular, los carcinomas de mama se han clasificado también en base a alteraciones genéticas y epigenéticas y para ello se han empleado diversas plataformas, entre ellas, microarreglos de ADN, matrices de metilación de ADN, secuenciación de miRNA y secuenciación del exoma, que se complementan con análisis computacional (Harbeck *et al.*, 2019).

Cáncer de mama triple negativo: un reto clínico y biológico

El cáncer de mama triple negativo es el tipo de cáncer en el que no se presenta positividad a los receptores de estrógeno y progesterona, y hay una falta de sobreexpresión HER2. (Goh *et al.*, 2020; Wahba & El-Hadaad, 2015). Este fenotipo está enriquecido en mutaciones en genes involucrados a los mecanismos de reparación de ADN por recombinación homóloga como BRCA1/2.

Se ha reportado una frecuencia del cáncer de mama triple negativo de entre el 12% al 20% de todos los casos de cáncer de mama y este tumor se caracteriza por un comportamiento clínico agresivo, generalmente se asocia a un peor pronóstico y una supervivencia global corta debido al intervalo corto libre de enfermedad y un comportamiento más agresivo en el entorno metastásico; además de que es particularmente agresivo e invasivo, a pesar de tener las tasas más altas de respuesta clínica a la quimioterapia neoadyuvante. (Cataldo *et al.*, 2020; Goh *et al.*, 2020; Wahba & El-Hadaad, 2015). Se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres jóvenes y premenopáusicas (Wahba & El-Hadaad, 2015) y en población mexicana se ha reportado una incidencia creciente de pacientes jóvenes en comparación de otras poblaciones (Reynoso-Noverón *et al.*, 2017).

Dado el alto nivel de heterogeneidad genética de estos tumores, el conocimiento de su patogénesis molecular es de suma importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Ozawa *et al.*, 2018). Se han identificado seis subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo basado en el transcriptoma de las células tumorales, dos de ellos de tipo basal (BL1 y BL2), un inmunomodulador (MI), un mesenquimatoso (M), un subtipo mesenquimatoso tipo troncal (MSL) y un subtipo de receptor de andrógenos luminal (LAR) (Tabla 2) (Lehmann *et al.*, 2011). Las características propias de cada subtipo pueden ser útiles en la selección de biomarcadores, el desarrollo de fármacos y el diseño de ensayos clínicos para brindar una terapia apropiada. Los subtipos BL1 y BL2 presentan mayor expresión de genes de respuesta al daño del ADN y del ciclo celular, además de que son

altamente proliferativas debido a una alta expresión de Ki-67. Estas características sugieren que estos subtipos responden preferentemente a quimioterapéuticos antimetabólicos como los taxanos; por su parte, el tipo BL2 muestra genes involucrados en la señalización del factor de crecimiento, así como en la glucólisis y gluconeogénesis. El subtipo MI se caracteriza por enriquecimiento en procesos inmunes como la señalización de células inmunitarias, señalización de citoquinas, procesamiento y presentación de antígenos, y señalización a través de vías de transducción de señales inmunitarias centrales, este subtipo suele asociarse con un pronóstico favorable a pesar de su alto grado histológico y representarían a los tumores que pudieran tener mayor beneficio de la inmunoterapia. Los subtipos M y MSL se encuentran enriquecidos en componentes y vías involucradas en la motilidad celular, vías de diferenciación celular; es decir en genes asociados con la transición epitelial-mesenquimal, en cuanto al subtipo M, presenta genes vinculados a las vías de señalización del factor de crecimiento y el MSL está enriquecido en los genes involucrados en la angiogénesis, y expresa niveles bajos de genes de proliferación a diferencia del subtipo M. El subtipo LAR presenta genes asociados a vías reguladas hormonalmente, incluida la síntesis de esteroides, el metabolismo de las porfirinas y el metabolismo de los andrógenos / estrógenos (Lehmann *et al.*, 2011).

Tabla 2. Tipos de cáncer de mama triple negativo. (Zaharia & Gómez 2014)

Tipo	Vías canónicas
Basal 1	Genes del ciclo celular. Reparación de ADN y proliferación.
Basal 2	Señalización de factores de crecimiento
IM	Genes involucrados en procesos de inmunidad celular
M	Genes relacionados con la movilidad celular, diferenciación celular, y con las vías de receptores que interaccionan con la matriz extracelular
MSL	Procesos biológicos similares a M, pero con señalización de factores de crecimiento y enriquecido con genes asociados a la transición epitelial-mesenquimal.
LAR	Genes relacionados con la señalización del receptor de andrógeno

Tratamiento actual para los tumores de cáncer de mama triple negativo

Las modalidades de tratamiento para el cáncer de mama dependen principalmente del subtipo tumoral, el estadio, tamaño de tumor y el estado del ganglio linfático (Lakshmi *et al.*, 2021). El manejo del cáncer de mama es multidisciplinario e incluye abordajes locorregionales (cirugía y radioterapia) y de terapia sistémica.

El cáncer de mama triple negativo tiene opciones de tratamiento limitadas, presenta más frecuentemente desenlaces con recurrencia y la metástasis, y tiene un mal pronóstico. La razón principal es que la expresión de ER, PR y HER2 es negativa, lo que hace que las terapias endócrinas específicas y las terapias dirigidas sean ineficaces. Por lo tanto, la quimioterapia se ha convertido en el enfoque principal para el tratamiento de CMTN (Yin, Duan, Bian, & Yu, 2020). La cirugía aunada a la quimioterapia o de manera individual suele ser otra opción viable para tratar el cáncer de mama triple negativo. (Cataldo *et al.*, 2020; Goh *et al.*, 2020; Wahba & El-Hadaad, 2015). En los últimos años, una gran cantidad de literatura ha demostrado que el uso de regímenes de quimioterapia neoadyuvante en el tratamiento del CMTN tiene una tasa de remisión patológica (ausencia de todos los signos de cáncer en muestras de tejido obtenidas durante una cirugía o una biopsia después del tratamiento) significativamente más alta que para el cáncer de mama con receptores hormonales positivos y puede mejorar significativamente el pronóstico de los pacientes al tener respuesta patológicas completas (Yin *et al.*, 2020).

A pesar de la terapia de primera línea, la recurrencia y las metástasis ocurren con frecuencia en los 3 años posteriores a la cirugía y la tasa de supervivencia a 5 años para estas pacientes es baja (Goh *et al.*, 2020). Al ser el cáncer de mama triple negativo una enfermedad heterogénea con distintos subtipos moleculares se espera también una gran variabilidad en la respuesta a la quimioterapia y la eficacia de los fármacos, lo que a menudo es limitada por la quimio-resistencia (Goh *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, la radioterapia se administra en pacientes con cáncer de mama triple negativo después de una mastectomía o cirugía de mama conservadora, pero aún existe controversia sobre este tema. Las pacientes que presentan este fenotipo de cáncer de mama son altamente radiosensibles, en parte por la deficiencia de los mecanismos de reparación por recombinación homóloga, por lo que presentan un fenotipo deficiente en la reparación de rupturas de ADN de doble hebra. Si la cirugía es seguida de radioterapia, la mama y el tejido circundante podrían erradicar los focos tumorales deficientes en mecanismos de reparación de ADN y, por lo tanto, disminuir la recurrencia local en esas pacientes (Wahba & El-Hadaad, 2015).

Por ello, la quimioterapia, resulta ser la opción más viable para el tratamiento de este fenotipo. Las estrategias terapéuticas se dirigen a complejos de reparación de ADN empleando compuestos de platino y taxanos, a P53 a partir de taxanos, o contra la proliferación celular a partir de un régimen con antraciclina. La neoadyuvancia, que se refiere a la administración del tratamiento como primer paso para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía, es el tratamiento con mayor beneficio y el indicado en guías clínicas. El tratamiento neoadyuvante recomendado se basa en 6-8 ciclos de quimioterapia ya que se asocia con mayores posibilidades de Respuesta patológica completa (RPC) (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021).

Cáncer de mama triple negativo en etapas tempranas

En la mayoría de los casos se requiere terapia sistémica, que puede ser administrada antes de la cirugía (neoadyuvante) en mujeres con tumores grandes para reducir el tamaño del tumor o para evaluar la respuesta del tumor *in vivo*. La administración de quimioterapia neoadyuvante se ha convertido en el estándar, ya que la respuesta patológica completa se correlaciona con el resultado del paciente y la elección de la terapia adyuvante puede diferir según el estado de esta. La terapia sistémica puede ser administrada después de la cirugía (adyuvante) si el resultado quirúrgico o los biomarcadores indican un mayor riesgo de recurrencia (Harbeck *et al.*, 2019). La cirugía conservadora de mama es el tratamiento estándar en pacientes con cáncer de mama temprano y/o histologías y perfiles biológicos

favorables, consiste en la escisión completa del tumor primario, sin extraer todo el tejido mamario, como se realizaba en la mastectomía que era el estándar histórico. (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

La terapia sistémica es muy efectiva para pacientes con cáncer de mama temprano. La elección del tratamiento depende de las características clínicas. En cáncer de mama triple negativo, la quimioterapia es el estándar y normalmente se administran antraciclinas y taxanos (Harbeck *et al.*, 2019).

El consenso mexicano sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario recomienda el empleo de esquemas basados en antraciclinas, debido al beneficio en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Las antraciclinas dañan el ADN de las células cancerosas, provocándoles la muerte. Así mismo, el uso de taxanos ha demostrado beneficio clínico (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021). Los taxanos inducen citotoxicidad promoviendo la unión de la tubulina en los microtúbulos e inhiben su despolimerización. Las antraciclinas actúan a nivel del DNA, inhibiendo a la topoisomerasa II (Silva, Cervantes S, Delgadillo, & Erazo-Valle, 2011).

La capecitabina adyuvante debe considerarse en pacientes con enfermedad triple negativa que no alcanzan RPC a la neoadyuvancia. La inclusión en adyuvancia de otros medicamentos, como la gemcitabina, o las sales platinadas a los esquemas con antraciclinas y taxanos, no se recomienda de forma rutinaria, ya que los estudios hasta el momento no han demostrado beneficio clínico (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021). Finalmente, la radioterapia postoperatoria mejora la supervivencia general y libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama temprano con afectación en los ganglio linfáticos, ya sea mediante la eliminación de células tumorales residuales y/o en la disminución del tamaño del tumor (Harbeck *et al.*, 2019). La tabla 3, resume las opciones de tratamiento para el cáncer de mama triple negativo.

Tabla 3. Tratamiento CMTN temprano.

Cáncer de mama temprano

	Quimioterapia neoadyuvante	Si no se obtiene pCR:
Triple negativo	Secuencia antraciclina-taxano (se puede agregar un agente de platino)	Quimioterapia. Capecitabina adyuvante

Cáncer de mama metastásico y recurrente

El cáncer de mama metastásico es una enfermedad heterogénea y los sitios comunes de diseminación son huesos, pulmones e hígado. Actualmente es una enfermedad tratable pero prácticamente incurable y el tratamiento depende del sitio y número de metástasis, las características del paciente, el inmunofenotipo tumoral y la sensibilidad o resistencia a los tratamientos oncológicos previos. Las pacientes con cáncer de mama metastásico reciben tratamientos que tienen como objetivo aliviar sus síntomas y prolongar el intervalo libre de progresión y la supervivencia global, así como mantener una adecuada calidad de vida. Generalmente, los tratamientos locales no son la base del tratamiento del cáncer de mama avanzado, pero son muy útiles en algunas situaciones, como las metástasis cerebrales y óseas (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019; Harbeck *et al.*, 2019).

El tratamiento estándar para pacientes con tumores triple negativos que presentan metástasis es la quimioterapia, sin que sea posible recomendar, en la actualidad, un esquema o secuencia específicos, se recomienda el tratamiento con fármacos como mono droga y de forma secuencial debido a la mejor tolerancia y menor deterioro de la calidad de vida (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021).

Las antraciclinas y taxanos son los agentes citotóxicos más activos para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y representan la piedra angular de la quimioterapia de primera línea. En pacientes previamente expuestas, las opciones de tratamiento incluyen capecitabina, gemcitabina, vinorelbina, o eribulina. La eribulina es el único fármaco que ha demostrado impacto en supervivencia global,

en pacientes previamente tratados con taxanos/antraciclinas, en población con tumores triple negativo (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021).

En pacientes con mutación germinal de BRCA1/2 se puede considerar el uso de olaparib (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021). El olaparib, es un inhibidor de PARP (Poli ADP Ribosa Polimerasa), una clase de enzima reparadora del ADN de una sola cadena. Su función principal es mantener la estabilidad del genoma, reparar el ADN y participar en la progresión del ciclo celular y la apoptosis, la inhibición de esta enzima conduce a la pérdida de la función de la reparación de ADN y, por lo tanto, a la apoptosis. Esta clase de fármacos pueden mejorar significativamente los efectos terapéuticos de la radioterapia y quimioterapia. Los inhibidores de PARP tienen efectos antitumorales significativos en los tumores con deficiencia de BRCA1/2, y el efecto de inhibición en los tumores con mutaciones en los genes BRCA1/2 es de 1000 veces mayor que en los tumores sin tales mutaciones. Hasta el 19,5% de los pacientes con cáncer de mama triple negativo portan mutaciones BRCA1/2, lo cual justifica el uso de esta clase de fármacos (Yin *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que las células tumorales pueden evadir el reconocimiento y la destrucción por parte del sistema inmunitario del huésped a través del sistema de control inmunitario; por lo tanto, bloquear el sistema de puntos de control inmunitario es una estrategia de tratamiento prometedora para lograr una inmunidad antitumoral eficaz (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021). El ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) es una proteína transmembranal de 40 kDa. La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) se une a PD-L1 y puede transmitir señales para inhibir la proliferación de células T y promover el agotamiento de células T. A través de la unión de PD-L1 a PD-1 en la superficie de las células T, las células tumorales transmiten señales de inhibición en dichas células (Yin *et al.*, 2020). Por ello nuevas estrategias terapéuticas están dirigidas a interrumpir esta interacción y reactivar la actividad del sistema inmune contra las células tumorales.

En las tablas 4 y 5 se resumen y presentan algunas de las opciones terapéuticas indicadas por las guías clínicas en tumores triple negativos.

Tabla 4. Esquema de tratamiento CMTN metastásico recomendado por el Consenso Colima 2021.

ADYUVANCIA CON				
	Sin terapia	Taxano+antraciclina	Taxanos	antraciclina
1ª línea	Esquema basado en: Antraciclina Taxano	Capecitabina Eribulina (inhibe la fase de crecimiento de microtúbulos, por lo que detiene la propagación de las células cancerosas) Gemcitabina Vinorelbina Sales platinadas (pueden aplicarse en población con mutación germinal de BRCA)	Esquema basado en: Antraciclina	Taxano Capecitabina Gemcitabina
Otras opciones terapéuticas 1era línea	<ul style="list-style-type: none"> • Bevacizumab, un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) + quimioterapia (taxanos), incrementa la supervivencia libre de progresión. • Inhibidores de punto de control inmunitario: 1) Atezolizumab más nab-paclitaxel, como terapia de primera línea, pues demostró incremento en la supervivencia libre de progresión en la población PDL1 positiva; 2) Pembrolizumab más quimioterapia (paclitaxel, nab-paclitaxel o gemcitabina más carboplatino), en pacientes con cáncer de mama triple negativo avanzado, que expresan PDL1, como terapia de primera línea, demostró ser superior en contraste con la quimioterapia en monoterapia, en la supervivencia libre de progresión 			
2ª línea	De acuerdo con el tratamiento utilizado previamente			
3ª línea	De acuerdo con el tratamiento utilizado previamente			

La elección del tratamiento depende de las características de las pacientes la tolerancia y respuesta a tratamientos previos, así como de la disponibilidad de los fármacos (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021). La duración del tratamiento no se ha

definido por completo y puede variar en cada paciente. En la práctica clínica se recomienda continuar la quimioterapia hasta la progresión o toxicidad, dependiendo del fármaco aplicado (intravenoso frente a oral), las dosis máximas acumuladas y el impacto en la calidad de vida de las pacientes (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2021).

Tabla 5. Tratamiento para el cáncer de mama metastásico/avanzado.

Cáncer de mama avanzado			
Triple negativo	Si hay mutaciones de BRCA de la línea germinal presentes: inhibidores de PARP	<p>Quimioterapia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si >1 % de tinción de células inmunitarias PD-L1, nab-paclitaxel más atezolizumab es una opción en primera línea • Combinación con platino es una buena opción 	<p>Quimioterapia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Usar monoterapia secuencial • Los agentes de primera línea preferidos para pacientes tratados previamente con antraciclinas y taxanos son capecitabina, vinorelbina o eribulina • Posible reexposición a antraciclinas o taxanos (si ≥ 1 año desde la exposición previa) • En combinación con quimioterapia con taxanos o capecitabina, bevacizumab (un anticuerpo anti-VEGF) es una opción en la primera línea

Otro esquema en el tratamiento de este cáncer incluye la radioterapia, que tiene un papel crucial en el alivio de los síntomas de las metástasis óseas, cerebrales y de tejidos blandos, esta debe prescribirse con un enfoque multidisciplinario e individualizado (Harbeck *et al.*, 2019). La radioterapia también podría inducir una respuesta inmunitaria sistémica, que podría actuar sobre células tumorales no irradiadas vecinas (efecto espectador) o distantes (efecto abscopal). Además, la

radioterapia, ha despertado el interés en el campo de la inmunoterapia, debido a que una buena proporción de los tumores triple negativos son “fríos”, no infiltrados por células inmunes que responden pobremente a la inmunoterapia, de este modo la radioterapia podría estimular la respuesta inmune en el microambiente (Harbeck *et al.*, 2019). Los estudios clínicos sobre uso combinado de inmunoterapia y radioterapia en cáncer de mama se centran en los subgrupos de pacientes con tumores oligometastásicos (aquellos en los que el paciente presenta escasas metástasis en una o dos partes diferentes del cuerpo y suelen ser pequeñas), ya que son los subtipos con mayor expresión de marcadores inflamatorios e inmunológicos (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

El tratamiento del cáncer de mama está en constante evolución, lo que ha mejorado el pronóstico y se ha desarrollado un nuevo enfoque terapéutico gracias al impacto de la medicina genómica, la medicina de precisión que permite la elección del tratamiento y estrategias de prevención tomando en cuenta la variabilidad individual en los genes, la composición en los perfiles ómicos, el entorno y el estilo de vida de cada paciente. El objetivo de la medicina de precisión o personalizada es dirigir los tratamientos correctos a los pacientes correctos en el momento correcto. Los avances en la medicina de precisión han permitido descubrir nuevos tratamientos que se adaptan a las características específicas de las personas y así los médicos pueden seleccionar tratamientos que mejoren las posibilidades de supervivencia y reduzcan la exposición a efectos adversos en los pacientes con cáncer (Li *et al.*, 2017).

Retos en el tratamiento y diagnóstico de cáncer de mama triple negativo

La conducta biológica del cáncer de mama triple negativo suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a presentar metástasis, comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando las metástasis viscerales, asimismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte, con respecto a los tumores dependientes de hormonas (Zaharia & Gómez, 2014). El cáncer de mama triple negativo es un padecimiento heterogéneo y

complejo, además, debido a que el diagnóstico convencional de cáncer de mama no incluye perfiles genéticos, se dificulta la apropiada identificación de subtipos intrínsecos moleculares que pudieran mejorar a la elección del tratamiento.

El diagnóstico, manejo y seguimiento representa un reto, pues a pesar de las altas tasas de respuesta a la quimioterapia, estas no son prolongadas, los resultados iniciales favorables son cortos por los mecanismos de resistencia. Estos tumores no responden a la terapia endocrina y no existe terapia blanco eficaz disponible con beneficio clínico prolongado. Por ello, las investigaciones sobre esta neoplasia están principalmente orientadas a la búsqueda de biomarcadores terapéuticos. (Zaharia & Gómez, 2014).

Además, en la mayoría de los sistemas de salud, la terapia sistémica es la única alternativa disponible para tratar el cáncer de mama triple negativo, a pesar del estudio de prometedoras terapias dirigidas como inmunoterapia, inhibidores de PARP, inhibidores de factores de crecimiento e inhibidores de mTOR, que podrían implementarse dependiendo del subtipo molecular de cáncer de mama triple negativo, recordando que cada subtipo presenta un perfil genético muy característico, sin embargo, estas opciones no están al alcance de todas las pacientes, y como se mencionó anteriormente, el diagnóstico de este padecimiento no incluye perfiles genéticos (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2019).

A pesar de que el CMTN, presenta mejores tasas de respuestas patológicas, solo el 30% de los pacientes tratados en neoadyuvancia con quimioterapia logran la RPC, y aquellas que no logran la respuesta patológica completa, tendrán cursos clínicos más agresivos a 5 años (Cortazar *et al.*, 2014).

Una limitante importante en el éxito del tratamiento del cáncer de mama triple negativo es la resistencia a la quimioterapia, es por ello por lo que se requiere el estudio de los mecanismos por los cuales las células desarrollan quimiorresistencia para detectarlos y combatirlos, lo cual traería consigo nuevas opciones de tratamiento con dianas terapéuticas bien definidas.

Mecanismos de resistencia de fármacos que favorecen la limitada respuesta a tratamiento en cáncer

Las células tumorales tienden a desarrollar mecanismos de resistencia al tratamiento luego de un periodo de estrés farmacológico, inicialmente, el 90% de los pacientes con cáncer de mama y 50% de los que presentan lesiones metastásicas, responden al tratamiento quimioterápico, aunque este varía en cada uno de los subtipos tumorales (Fodale, Pierobon, Liotta, & Petricoin, 2011). La quimiorresistencia es un obstáculo importante para el tratamiento exitoso del cáncer de mama, ya que no permite el efecto esperado en la reducción del tamaño del tumor luego de la administración del fármaco y el cáncer puede recurrir y progresar después de una respuesta "positiva" inicial (Chen *et al.*, 2014).

La resistencia a fármacos puede surgir debido a factores propios del hospedero, así como alteraciones genéticas o epigenéticas en las células cancerosas. La composición de los cocteles de fármacos, así como un óptimo esquema de administración de fármacos para los pacientes es clave para prevenir la aparición de resistencia (Foo & Michor, 2014).

Entre los mecanismos desarrollados por las células para superar el efecto de los compuestos farmacológicos se encuentran, la alteración del metabolismo de los fármacos, la alteración en la señalización de las vías intracelulares, la comunicación cruzada entre diferentes receptores de membrana, la modificación de la señalización apoptótica y la interferencia con la replicación celular (Fodale *et al.*, 2011).

La alteración del metabolismo de fármacos involucra diversas enzimas que participan en el proceso de desintoxicación o transportación, lo cual altera la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de fármacos. Así mismo, la resistencia puede estar dada por una desregulación de las enzimas que participan en diferentes etapas del metabolismo celular. La literatura reporta que las bombas

transmembranales son una de las protagonistas en el desarrollo de la resistencia a terapia, al aumentar la desintoxicación celular, la salida y modificación de los fármacos, o disminuir la absorción de estos, en conjunto estas alteraciones son responsables de una reducción general del suministro de terapia bioquímica a las moléculas diana. (Fodale *et al.*, 2011). Otro mecanismo que impulsa la adaptación celular y la supervivencia de las células ante los fármacos es la sobreexpresión y la activación (fosforilación) de proteínas clave en la transmisión de señales. La resistencia a los agentes que actúan sobre los microtúbulos como los taxanos, se desarrolla a través de la alteración de los componentes de los microtúbulos y señalización apoptótica deficiente (mediada por p53, bcl-2, bcl-xl), se ha reportado que mutaciones en p53, generan alteraciones en la dinámica de los microtúbulos, que se asocia con la resistencia a paclitaxel en una línea celular de cáncer de pulmón humano (Fodale *et al.*, 2011; Galmarini *et al.*, 2003).

De igual forma, el efecto de los fármacos está asociado a la expresión de genes de muerte celular y la regulación de genes de supervivencia, la susceptibilidad de las células tumorales a la apoptosis inducida por el fármaco depende también del balance entre señales proapoptóticas y antiapoptóticas, por lo que, las anomalías en estas vías de señalización pueden impedir la muerte celular programada. Estas señales además generan estrés celular que induce cambios adaptativos y alteraciones genéticas que ayudan a la célula a sobrevivir a pesar de la presencia del fármaco. Las alteraciones en la expresión o la regulación de proteínas clave en la reparación del ADN, pueden incrementar la actividad de reparación del ADN y con ello, la resistencia a fármacos (Fodale *et al.*, 2011).

La tabla 6 presenta un resumen de los mecanismos de resistencia reportados en la literatura.

La caracterización de estos mecanismos de resistencia es útil para la identificación de nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores que pueden ayudar en la selección más adecuada del tratamiento.

Recientemente, diversas evidencias han descrito que los mecanismos de comunicación celular pueden participar activamente en la transferencia de mecanismo de resistencia. Una de las vías de comunicación con gran actividad es el intercambio de vesículas extracelulares las cuales son liberadas por células con diversas capacidades oncogénicas, y tienen la capacidad de transportar moléculas biológicamente activas a las células receptoras (Chen *et al.*, 2014; Ozawa *et al.*, 2018; Stefanius *et al.*, 2021).

Tabla 6. Mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales

Mecanismos		Resistencia a
Metabolismo de los fármacos		
Citocromo P450	La oxidación de los agentes terapéuticos está comprometida debido a los polimorfismos genéticos que inducen la alteración de la funcionalidad de las proteínas y la susceptibilidad a los fármacos.	Ifosfamida, vinblastina, etopósido y doxorubicina
GST	Actividad de conjugación mejorada	Agentes alquilantes
Resistencia mediada por la membrana celular e intracelular		
Proteína MDR	Aumento de la salida del agente quimioterapéutico desde el citosol a la matriz extracelular o los orgánulos intracelulares.	Antraciclinas, taxanos, alcaloides de la vinca, mitoxantrona
Receptor de tirosina quinasa	Heterodimerización y activación cruzada de receptores; amplificación o sobreexpresión de RTK compensatorias; mutación secundaria <i>ex novo</i> ; trastorno de los supresores de tumores	Anticuerpo monoclonal, pequeños inhibidores de la tirosina quinasa, tamoxifeno

Citoesqueleto	Estabilización o desestabilización excesiva de la estructura dinámica de los microtúbulos	Taxanos y alcaloides de la vinca
División celular y muerte programada		
Apoptosis defectuosa	Mutación en supresores de tumores, hiperactivación de vías de supervivencia.	Doxorrubicina, agentes alquilantes
Alteración de la replicación o reparación del ADN	Interferencia con enzimas que "interactúan" con el ADN, como la topoisomerasa	Etopósido, irinotecán, doxorrubicina, gemcitabina

Comunicación celular

La comunicación celular es de suma importancia para mantener la homeostasis en un organismo, en ella se involucran diversos mecanismos que permiten transmitir la información entre células, tejidos y órganos. En la coordinación de la comunicación y la respuesta a las moléculas de señalización se encuentran involucradas miles de reacciones químicas (Solomon, Berg, & Martin, 2013). La señalización celular engloba los mecanismos empleados por las células para comunicarse entre sí, en general implica una secuencia de cuatro procesos: la célula envía una señal que debe ser transportada, posteriormente se da la recepción de la señal y se realiza la transducción de la señal para que finalmente se dé una respuesta celular.

Las células se comunican en diversas formas, incluyendo la más directa, a través de uniones celulares, mediante señales eléctricas, contacto temporal célula a célula, y señales químicas (Solomon *et al.*, 2013). La comunicación celular también involucra la secreción de las moléculas y vesículas extracelulares que viajan a otras células y fluidos. Los exosomas son reconocidos como un potente mecanismo de comunicación intercelular (Goh *et al.*, 2020; Stefanius *et al.*, 2021).

Exosomas como vía de intercambio de mensajes moleculares

Los exosomas son vesículas de 30 a 200 nm de diámetro, de origen endosómico, liberadas por prácticamente todos los tipos de células, incluyendo las células tumorales, al espacio extracelular tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2014; Goh *et al.*, 2020; Lakshmi *et al.*, 2021; Stefanius *et al.*, 2021).

Estas vesículas extracelulares están compuestas por una membrana de bicapa lipídica con proteínas transmembrana, proteínas citoesqueléticas, proteínas de tráfico de membrana, moléculas de adhesión celular, moléculas inmunorreguladoras, receptores de superficie celular, etc. (Figura 3). Los componentes intravesiculares incluyen chaperones moleculares, enzimas, ácidos nucleicos, mRNA, miRNA, LncRNA, enzimas, proteínas citoesqueléticas, proteínas para la biogénesis vesicular y moléculas de señalización (Lakshmi *et al.*, 2021). Presentan características como tamaño nanométrico, estabilidad en fluidos biológicos, potencial para transportar material celular, biocompatibilidad, afinidad hacia células diana, capacidad para cruzar barreras celulares y exhiben proteínas específicas (Lakshmi *et al.*, 2021).

La función primaria que se les atribuye es la comunicación celular, pues además de ser liberados por las células, tienen la capacidad de transportar moléculas bioactivas a otras células y las células receptoras a su vez las internalizan mediante endocitosis, fagocitosis, micropinocitosis o fusión con la membrana plasmática por receptores o lípidos. Debido a su tamaño, pueden moverse fácilmente a través de los espacios de los tejidos y los sistemas circulatorios, es por ello por lo que se encuentran en casi todos los fluidos corporales.

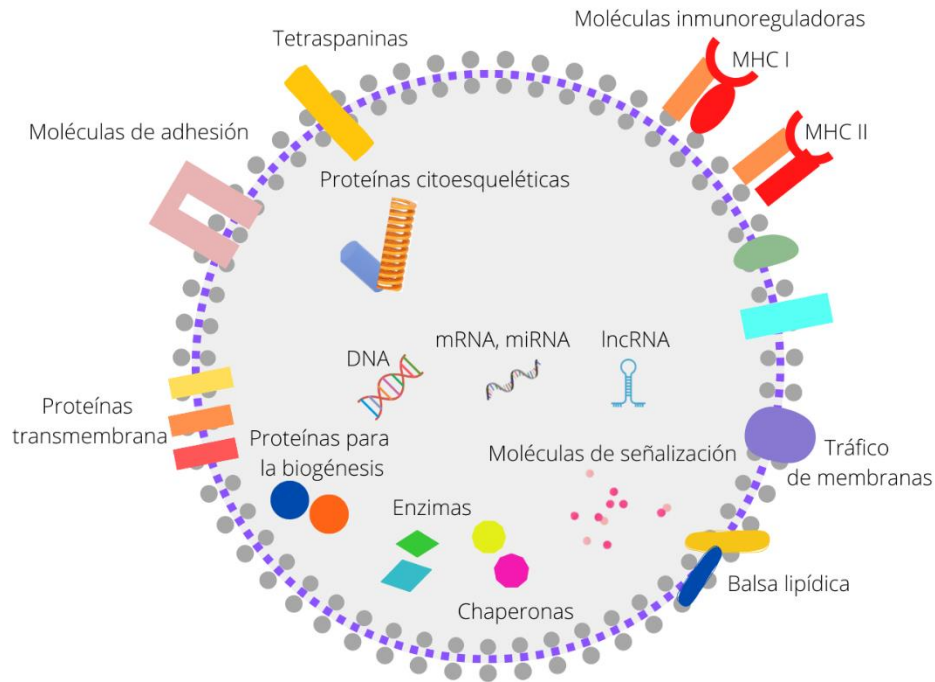


Figura 3. Arquitectura molecular de los exosomas. La membrana de bicapa lipídica tiene proteínas de distintas clases y los componentes intravesiculares incluyen enzimas, ácidos nucleicos, proteínas del citoesqueleto, proteínas para la biogénesis vesicular y moléculas de señalización. Adaptado de Lakshmi y colaboradores, 2021.

Contenido molecular exosomal

Los exosomas pueden contener y transportar diversas cargas biológicas debido a su origen endocítico, aunque inicialmente se describieron como portadores de desechos celulares, ahora se sabe que desempeñan un papel clave en la comunicación intercelular, en el mantenimiento de la fisiología o para desencadenar la progresión de una enfermedad (Goh *et al.*, 2020; Stefanius *et al.*, 2021). Pueden portar ARN (codificante y no codificante), ADN (genómico y mitocondrial), proteínas, lípidos, metabolitos y otros constituyentes moleculares altamente representativos de sus células de origen. (Goh *et al.*, 2020; Lakshmi *et al.*, 2021) y tienen la capacidad de entregar dicha información genética y molecular a células vecinas y distantes.

La célula receptora puede ser cercana a la célula que liberó los exosomas o incluso, estos pueden llegar a células distantes a través de la circulación. La interacción de

las vesículas extracelulares con las células y la entrada determina los efectos funcionales en la célula receptora. Incluso, la superficie de la membrana vesicular puede desencadenar la señalización a través de la interacción con receptores/ligandos en la superficie celular sin que se dé la entrada. En muchos casos, la funcionalidad del contenido de las vesículas extracelulares depende de la entrada en el citoplasma y, potencialmente, incluso en el núcleo, y de la liberación del cargo exosomal (Abels & Breakefield, 2016).

Los exosomas, pueden internalizarse en las células diana a través de la fusión con la membrana plasmática o por medio de endocitosis. La captación a través de la endocitosis se puede clasificar en los diferentes tipos de procesos, que incluyen endocitosis mediada por clatrina o caveolina, por balsas lipídicas, macropinocitosis y fagocitosis (Abels & Breakefield, 2016). Actualmente se está investigando el papel de los exosomas por su uso potencial en el diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades y como vehículos de biomarcadores relevantes de condiciones biológicas específicas (Goh *et al.*, 2020).

Importancia de los exosomas en cáncer de mama.

Diversos estudios han demostrado que los exosomas tienen un papel importante en la tumorigénesis y la progresión del cáncer de mama a través de la transferencia de elementos moleculares entre las diversas clonas que componen a un tumor. Así mismo, los exosomas permiten a las células tumorales tener una comunicación bilateral con el microambiente tumoral. La evidencia emergente sugiere que el intercambio de ARN exosomales codificante y no codificantes (ncARN) como los microARNs y lncARNs, alteran el transcriptoma de la célula receptora, acelerando la progresión del cáncer de mama (Lakshmi *et al.*, 2021).

En las condiciones precancerosas, los exosomas están implicados en la respuesta inflamatoria que contribuye a la adquisición de varios de los principales marcadores del cáncer. Así mismo, los exosomas presentan un papel importante en la inducción de la transición epitelio mesénquima, así como en la reprogramación del

microambiente tumoral, que desencadena el proceso de metástasis. Diversos estudios han demostrado que los exosomas derivados de células tumorales son participantes activos en la inducción de alteraciones moleculares en células circundantes del microambiente tumoral que promueve la tumorigénesis multifocal y, en última instancia, da como resultado la tumorigénesis. Estudios *in vitro* demuestran que los exosomas derivados de tumores transfieren biomoléculas promotoras de tumores a las células receptoras lo que conduce a la activación de vías de señalización y la inducción de mutaciones, lo que resulta en cambios irreversibles en las células receptoras, este proceso representa una posible invasión tumoral a través del desarrollo de tumores satélites cercanos al sitio primario, lo que promueve la resistencia a la quimioterapia (Stefanius *et al.*, 2021). Otro rasgo interesante de los exosomas derivados de tumores, es su capacidad para inducir cambios en la respuesta de citotoxicidad a los agentes quimioterapéuticos. Diversos autores han reportado que exosomas aislados de líneas celulares de cáncer de mama resistentes a algún fármaco son capaces de transferir dicha resistencia a las células sensibles.

Participación de los exosomas en la resistencia a fármacos

Como se ha mencionado, la resistencia a fármacos es un factor limitante para un tratamiento exitoso en pacientes con cáncer de mama triple negativo, los exosomas facilitan la resistencia favoreciendo procesos como la salida de fármacos intracelulares, la inhibición de la apoptosis, la mejora de la reparación del ADN y el transporte de bombas de salida de fármacos a las células sensibles a los fármacos.

Varios estudios han demostrado la influencia de los exosomas en la quimiorresistencia, se ha descrito que las células de cáncer de mama resistentes a paclitaxel y doxorubicina pueden transferir el fenotipo quimiorresistente a través de los ARN exosomales miR-100, miR-222, miR-30a y miR-17 (Lakshmi *et al.*, 2021). Mingli Han y colaboradores reportaron que el miR-567 estaba desregulado en pacientes resistentes a trastuzumab, y el tratamiento con miR-567 exosomal podría suprimir la autofagia al inhibir ATG5, lo que daría lugar a la reversión de la

resistencia a trastuzumab, un fármaco anti-HER2. Aunado a ello, el ARN anti sentido AFAP1-AS1 contenido en exosomas podría inducir resistencia al trastuzumab al unirse con la proteína AUF1 y activar la traducción de HER2. Otro estudio ha demostrado que la transferencia exosómica del LncARN H19 aumentó la resistencia a la doxorrubicina en las células mamarias (Lakshmi *et al.*, 2021). Por ello es factible explotar terapéuticamente estrategias que interfieran con la liberación de exosomas y de esta forma limiten la comunicación mediada por exosomas para superar la resistencia a los fármacos.

Antecedentes directos:

Una exploración funcional y transcriptómica que identificó ARNs exosomales asociados a la quimiorresistencia en modelos *in vitro* y muestras humanas de tumores

Diversos trabajos han demostrado el papel de los exosomas y su contenido, especialmente del ARN, como mediadores de vías oncogénicas, sin embargo, aún no se describe totalmente esta relación, particularmente en el cáncer de mama triple negativo, un ejemplo de ello, es que no se conocen bien los mecanismos moleculares que propician los efectos de resistencia a terapia, potencialmente transmitidos por exosomas y no se han identificado ampliamente asociaciones entre estos y el grado de sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos. Comprender los mecanismos e interacciones entre las células y su comunicación vía exosomal, permitiría identificar qué subconjuntos de pacientes se beneficiarían de la quimioterapia. Los datos preliminares obtenidos por el laboratorio receptor respaldan el papel de los exosomas y de los ARN exosomales en la resistencia a la terapia. Así mismo, datos previos, utilizando un abordaje preclínico, han mostrado que el condicionamiento *in vitro* con exosomas provenientes de células resistentes a antraciclinas y taxanos, regulan la respuesta a estos fármacos en células sensibles. Adicionalmente, se identificó una firma asociada a la respuesta del tratamiento mediada por ARNs exosomales entre los que se encuentran CDH6, TMPRSS4, miR-574-5p y miR-7977, a partir de un abordaje integrativo de datos transcriptómicos de experimentos previos *in-vitro* y de análisis *in-sílico* de bases de datos (Datos preliminares, no publicados).

De forma particular, resultados preliminares del laboratorio han identificado la expresión alterada de TMPRSS4 en exomas de modelos de células resistentes a quimio fármacos y su sobreexpresión en modelos condicionados que adquieren resistencia al tratamiento, lo cual sustentaría el hecho de que desempeñe un papel en el desarrollo de la quimiorresistencia.

TMPRSS4: Un cargo exosomal relevante con posible impacto en la resistencia a quimioterapia en cáncer de mama triple negativo

Las proteasas están implicadas en una variedad de procesos biológicos como lo son el desarrollo postnatal y la homeostasis, además, juegan un papel importante en la progresión tumoral y la metástasis, pues contribuyen a la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, facilitan la invasión de células cancerosas y modifican el microambiente tumoral, además se ha demostrado su capacidad de activar cascadas de señalización intracelular que favorecen la supervivencia de las células tumorales y la resistencia a la quimioterapia (Exposito *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017; Tanabe & List, 2017), y al estar ubicadas en la superficie celular, median la transducción de señales entre la célula y su entorno circundante. Se han descrito a las proteasas de la superficie celular como modificadores proteolíticos de blancos particulares, incluidos los factores de crecimiento y los receptores activados por proteasas, que son fundamentales para la activación de las vías de señalización oncogénicas (Tanabe & List, 2017).

Las serinas proteasas transmembrana de tipo II, son una subfamilia que participa en la regulación de señalización celular en la membrana plasmática y en la matriz extracelular (Li *et al.*, 2017; Xiao, Zhang, Peng, Wei, & Ma, 2021). Los 17 miembros de esta subfamilia tienen en común un dominio N-terminal citoplasmático corto, un dominio transmembranal y un dominio proteolítico extracelular (Kim *et al.*, 2019). Varios autores han reportado que las proteasas se encuentran desreguladas en el cáncer, lo que implica sus posibles funciones en la tumorigénesis y/o progresión del cáncer (Exposito *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2021).

TMPRSS4 es un miembro de las serinas proteasas transmembrana de tipo II, que fue identificada por primera vez en el cáncer de páncreas y se expresa altamente en diferentes tumores sólidos, como en cáncer de ovario, tiroides, colorrectal, de mama, de cuello uterino, de vesícula biliar, gástrico y de hígado (Exposito *et al.*, 2019; Tanabe & List, 2017). La expresión elevada de TMPRSS4 promueve la malignidad celular, el crecimiento del tumor primario y la metástasis multiorgánica y se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con histología de células escamosas, cáncer de mama triple negativo, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer de colon y cáncer de próstata (Exposito *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019).

De forma relevante la expresión de esta proteasa se asocia con la pérdida de E-cadherina y el aumento de la expresión de vimentina y otros marcadores de transición epitelio mesénquima (Exposito *et al.*, 2019). Estudios en modelos animales y células de cáncer de pulmón revelaron que el silenciamiento de TMPRSS4 da como resultado una reducción significativa en la proliferación, la capacidad clonogénica y la invasión de las células tumorales. También se ha demostrado que la sobreexpresión de TMPRSS4 en células SW480 (cáncer de colon) provoca una mayor invasión *in vitro*, y una mayor metástasis en el hígado (Tanabe & List, 2017).

Expósito y colaboradores, dedujeron que el silenciamiento de TMPRSS4 altera el ciclo celular, afecta la proliferación e induce la muerte celular, así mismo, se observaron cambios en la expresión génica particularmente de genes involucrados en la proliferación celular y en la apoptosis, lo cual conduce a un deterioro del injerto tumoral y del crecimiento tumoral. Además, las células que carecen de TMPRSS4 están muy sensibilizadas al efecto citotóxico de diferentes fármacos de quimioterapia, como lo demuestran los experimentos *in vitro* reportados, en los cuales se probó el efecto de cisplatino, docetaxel, etopósido, paclitaxel, pemetrexed, 5-FU y metotrexato en células carentes de TMPRSS4, que resultaron ser mucho más sensibles que las células de control, y posteriormente, en modelo

murino, en el que los tumores fueron significativamente más pequeños en el grupo tratado con cisplatino en ausencia de TMPRSS4 (Exposito *et al.*, 2019).

Además, en un estudio realizado en 2019 por Assani y colaboradores, encontraron que la inhibición de TMPRSS4 aumentaba la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama triple negativo (Assani *et al.*, 2019).

Con base en estos hallazgos se ha propuestos que este subtipo de proteasas, representan un blanco viable para el desarrollo de agentes terapéuticos. Se ha demostrado que los agentes dirigidos a proteínas, incluidos los anticuerpos y los inhibidores afines modificados, así como los inhibidores de moléculas pequeñas, bloquean eficazmente su actividad en entornos *in vitro* o *in vivo* e inhiben algunos aspectos de la patogénesis del cáncer en modelos celulares y animales (Tanabe & List, 2017). Particularmente, la inhibición de TMPRSS4 puede representar una potencial estrategia terapéutica para reducir el crecimiento tumoral, así como la invasión y la metástasis. Además, el hecho de que los niveles altos de ARNm y proteína de TMPRSS4 se asocien con un peor pronóstico abre la posibilidad de que sea usado como biomarcador (Exposito *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019).

Solbi Kim y colaboradores, evaluaron dos derivados de 2-hidroxi-diarilamida como terapias potenciales contra las células cancerosas positivas para TMPRSS4: KRT1853 e IMD-0354, que inhiben la señalización celular mediada por TMPRSS4, dichos compuestos inhibieron la proliferación e invasión de las células cancerosas, así como la apoptosis inducida, siendo KRT1853 el tratamiento más eficiente. Este estudio demuestra que TMPRSS4 es un blanco molecular potencial contra el cáncer (Kim *et al.*, 2019).

Justificación

El cáncer de mama constituye la primera causa de muerte por tumores en las mujeres, y el subtipo triple negativo representa de entre el 10 al 20% del total de casos. Es también el subtipo más agresivo y las opciones de tratamiento para la mayor parte de las pacientes se reducen a la quimioterapia, aunado a esto, la

quimiorresistencia tiene un impacto no sólo en la respuesta clínica inmediata, sino también en el comportamiento agresivo postcirugía, limitando la supervivencia global y libre de enfermedad a 5 años. Por ello, es importante dilucidar los mecanismos detrás de la quimiorresistencia.

Los exosomas, representan un relevante mecanismo de comunicación celular, y se han involucrado en el desarrollo de quimiorresistencia en el cáncer de mama triple negativo ya que pueden contener diversas moléculas bioactivas capaces de regular la expresión de genes en las células receptoras e inducir la quimiorresistencia. Entre las moléculas bioactivas transportadas por los exosomas, se encuentran los ácidos nucleicos. Entender, el mecanismo por el cual el ARN de TMPRSS4 contribuye a la resistencia es de suma importancia para establecer su utilidad clínica en la predicción de la respuesta a quimioterapia.

Con base en lo anterior, se planteó que la comunicación celular, específicamente a través de exosomas, favorece la quimiorresistencia y confiere a las células tumorales tolerancia a la quimioterapia, a través de la reprogramación transcripcional y metabólica por la acción de los ARN exosomales. Dichos ARN exosomales podrían evaluarse en circulación para determinar el estado de resistencia a fármacos del tumor primario y obtener información acerca de la respuesta clínica esperada del paciente.

Para definir los posibles mecanismos que modulan la respuesta a terapia, se plantea el estudio funcional de ARNs candidatos que forman parte de la firma propuesta de resistencia a quimioterapia en el cáncer de mama triple negativo. A partir del análisis del panorama transcripcional, se identificarán mecanismos que contribuyen a conferir quimioprotección a las células tumorales, mediados por exosomas.

Hipótesis

El silenciamiento del gen TMPRSS4 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo a través de un siRNA generará cambios en la tolerancia de las células a la doxorubicina, paclitaxel y docetaxel.

Objetivos

Establecer las bases metodológicas y científicas para el estudio funcional del gen TMPRSS4 en la quimiorresistencia del cáncer de mama triple negativo.

Objetivos particulares

1. Realizar un entrenamiento dedicado sobre técnicas de biología molecular y cultivo celular para estandarizar las técnicas relevantes para el estudio in vitro del gen TMPRSS4.
2. Estandarización de condiciones de cultivo para los modelos celulares evaluados
3. Determinación de la IC50 de los fármacos en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT-549)
4. Estandarización de la transfección transitoria de secuencias siRNA para silenciamiento exógeno del gen TMPRSS4.

Metodología

Cultivo de las líneas celulares.

Se emplearon 3 líneas celulares de cáncer de mama triple negativo para recapitular parcialmente la heterogeneidad del cáncer de mama triple negativo: MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT-549 adquiridas en *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular MDA-MB-231 se estableció a partir de un derrame pleural en 1973, presenta una morfología mesenquimal y fusiforme formando una especie de red y se caracteriza por un rápido crecimiento y un fenotipo invasivo (R. Cailleau, Young, Olivé, & Reeves, 1974). La línea celular MDA-MB-468 fue aislada en 1977 por Cailleau y col. del derrame pleural de una paciente con adenocarcinoma

metastásico de mama, es de origen epitelial y su morfología es redonda (Relda Cailleau, Olivé, & Cruciger, 1978). La línea BT-549 fue aislada en 1978 por W.G. Coutinho y E.Y. Lasfargues. El tejido de origen consistía en un tumor ductal invasivo papilar que había hecho metástasis en 3 de los 7 ganglios linfáticos regionales (Characteristics & Conditions, 1992). Las células se crecieron en monocapa en placas Petri de 100 mm con medio RPMI para la línea MDAMB231 y DMEM para MDAMB468 y BT449 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO_2 , el medio de cultivo se recambió cada 48 horas y al alcanzar la confluencia. Las células fueron colectadas con tripsina de la siguiente forma: se retira el medio de cultivo y se realiza un lavado con PBS, se agregan 0.7 ml de tripsina al 0.05% y se incuba por 2 minutos, se retiró la tripsina con la suspensión celular, se agregó a un tubo de cónico con 5ml de medio y se centrifugó a 328 x g por 5 minutos, se conservó la pastilla para resuspenderla en medio de cultivo fresco.

Las células fueron almacenadas en congelación con una solución de DMSO al 10% en SFB. Para su descongelación se permitió se atemperaran para poder transferir el líquido que contiene a las células a un tubo cónico con 5ml con medio de cultivo. Posteriormente, se centrifugó a 328 x g por 5 minutos, posteriormente, se realizan uno o dos lavados con PBS dependiendo del tamaño de la pastilla celular (en caso de ser grande, se realizaron dos lavados) y se centrifugó para suspender la pastilla en medio de cultivo para pasar las células a las placas Petri.

Determinación de la concentración inhibitoria 50 de doxorubicina, docetaxel y paclitaxel

Se determinó la concentración de IC50, que se define como la concentración a la que un fármaco inhibe un proceso biológico en un 50%, de tres fármacos quimioterapéuticos (docetaxel 11.130 mM, paclitaxel 7.02 mM y doxorubicina 3.4 mM) en las tres líneas celulares. Docetaxel y paclitaxel, pertenecen a la familia de los taxanos, que se consideran fármacos antimetabólicos pues se unen a la β -tubulina, estabilizando los microtúbulos e impidiendo la división celular. La doxorubicina,

pertenece a la familia de las antraciclinas y su mecanismo de acción consiste en intercalarse en el ADN e inhibir a la topoisomerasa II, lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, además forma especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en citotoxicidad secundaria.

Luego de un paso previo de tripsinización, se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer, para ello, la pastilla celular obtenida después de un paso de centrifugación, se resuspendió en 5 ml el medio correspondiente. Se colocaron 10 μ l diluidos en la cámara de Neubauer para el conteo. Una vez cuantificadas un número específico de células se cultivaron en placas de 96 pozos con 100 μ l de medio de cultivo correspondiente. El número de células por pozo, dependía de la línea celular: para MDA-MB-231, se cultivaron 35,000 células por pozo a tratar al siguiente día o 17,000 células por pozo si se dejaban el fin de semana; para MDA-MB-468, se cultivaron 18,000 células por pozo a tratar al siguiente día o 8,000 si se dejaban en fin de semana, debido a que el tiempo de duplicación celular era muy corto en comparación con las otras dos líneas celulares; y para BT-549, se cultivaron 20,000 células por pozo a tratar al siguiente día o 12,000 si se dejaban en fin de semana, esta línea celular requirió especial atención pues en cuanto llegaba a confluencia comenzaban a desprenderse las células. Para realizar el tratamiento, se realizó la dilución del fármaco en medio de cultivo. De forma inicial se evaluaron al menos 8 concentraciones por fármaco y línea celular, una vez que se determinó la fase exponencial de las mismas se seleccionaron 3 o 4 concentraciones para ser analizadas.

Tras 24 horas de tratamiento para doxorubicina y 48 horas para paclitaxel y docetaxel, las células se fijaron, retirando el medio de cultivo con el fármaco y agregando 70 microlitros de solución fijadora (1% aldehído, 10% SFB en RPMI) a cada pozo. Esta solución se dejó actuar por 10 minutos, se retiró y se realizó un lavado con agua corriente y la placa se dejó secando. Una vez secas, se agregó a cada pozo 50 μ l de cristal violeta al 0.1% y se dejó 15 min para teñir las células, después, se retiró el cristal violeta y las placas se lavaron con agua corriente para

eliminar el exceso de cristal violeta no unido. Una vez secas, se agregó 50 µl de una solución de ácido acético al 10% a cada pozo con el fin de solubilizar el tinte ligado y se dejaron en agitación durante 20 minutos. Se leyó la absorbancia de los pozos a 570 nm en espectrofotómetro. Todos los experimentos fueron realizados en al menos sextuplicado técnico y repetidos en al menos tres experimentos independientes. Todos los experimentos incluían controles de tiempo inicial y tiempo final. Así como las concentraciones a evaluar.

Para cuantificar la respuesta a los tratamientos se realizó el recuento relativo de células con las métricas de sensibilidad al fármaco incluidos los valores IC50 o Emax. Todos los cálculos fueron realizados con el paquete R GRmetrics que proporciona funciones para analizar y visualizar datos de respuesta a fármacos con estas métricas en múltiples condiciones y líneas celulares. La diferencia estadística fue calculada con una prueba de t student, un valor de p igual o menor a 0.05 fue considerado como significativo. Todos los experimentos fueron analizados individualmente.

Estandarización de la transfección transitoria de secuencias siRNA para silenciamiento exógeno del gen TMPRSS4

La transfección es el proceso por el cual se introducen ácidos nucleicos en células eucariotas, puede ocurrir de manera estable, si el material genético se integra en el genoma; o transitoria en la que el material genético solo está presente por un periodo de tiempo limitado y no se integra en el genoma, este tipo de transfección permite silenciar la expresión de genes, al introducir ARNs pequeños de interferencia (siRNA), los cuales presentan una longitud de 21 nucleótidos (nt) que inician el silenciamiento génico al unirse a secuencias de ARN mensajero blanco y realizan un corte en el mismo para su degradación.

A través de un sistema siRNA Ambion (Cat: 43922420) se silenció TMPRSS4 mediante una transfección transitoria. Para llevar a cabo la transfección, las células se cultivaron en placas de 6 pozos, con 200,000 células por pozo y 1800 µl de

medio, se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 , luego de 24 horas, se realizó una dilución de lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM y siRNA-OptiMEM, para posteriormente juntar ambas diluciones en relación 1:1, es decir 150 μ l de la solución A (Tabla 7) y 150 μ l de la solución B (Tabla 8), para obtener un volumen de 300 μ l que se incubó durante 15 min para permitir la incorporación de la secuencia siRNA en los liposomas. Finalmente, se agregó a cada pozo 2200 μ l de medio Opti-MEM para un volumen final de 2500 μ l y una concentración de siRNA de 50uM. Antes de agregar el siRNA y el medio Opti-MEM, se retiró el medio de cada pozo y se realizaron dos lavados con PBS para retirar los residuos de medio de cultivo y de suero bovino fetal que pudiera inhibir la transfección. Se empleó lipofectamina 2000, que crea estructuras similares a liposomas que encapsulan los ARNs pequeños y permiten la entrada a las células, además se empleó medio Opti-MEM que crea orificios en la membrana celular y optimiza la transfección.

Tabla 7. Solución A para la transfección.

Transfectante	
Lipofectamina	6 μ l
Medio Opti-MEM	144 μ l

Tabla 8. Solución B para la transfección.

Dilución siRNA	
siRNA	2.5 μ l
Medio Opti-MEM	150 μ l

Extracción de ARN.

Se usó TRIzol para aislar el ARN de las células, para ello, se retiró el medio de cada pozo y se realizó un lavado con PBS para retirar los residuos de medio, se agregaron 400 μ L de TRIzol por tratamiento, para comenzar a lisar las células, se homogeneizó con ayuda de la micropipeta y se colocó en un microtubo de 1.75 ml donde se incubó 5 minutos en hielo con el fin de permitir la disociación del complejo de nucleoproteínas. Se agregaron 80 μ l de cloroformo a cada tubo para realizar la

extracción orgánica, a continuación, se mezcló con ayuda de un vórtex y se dejó incubar 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 x g a 4°C; en este punto, la mezcla se separa en dos fases, el ARN se encuentra en la fase acuosa que se localiza en la parte superior, por lo que se transfiere a un nuevo tubo colocando el tubo a 45° y con ayuda de una micropipeta.

A continuación, se empleó isopropanol para precipitar el ARN, para ello, se agregó 200µl a cada tubo con la fase acuosa, se incubó por 10 min a 4°C y se centrifugó por 10 min a 12,000 x g a 4°C. El ARN, forma un precipitado de tipo gel al fondo del tubo, se descartó el sobrenadante con la micropipeta. Se empleó etanol al 70% para llevar a cabo el lavado del ARN, para ello, se agregó a cada tubo 400 µl y se vortexeó brevemente, luego se centrifugó por 5 min a 7500 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante con la micropipeta y se dejó secar el pellet por 5-10 min.

Finalmente, el ARN se resuspendió en 12µl de agua libre de RNAsas, para determinar la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm empleando el equipo MultiSkanGO y empleando la siguiente ecuación:

$$c = A * f$$

Donde:

c: concentración de analitos en ng/µl

A: absorbancia

f: factor en ng-cm/µl

Factor ARN: 40 ng-cm/µl

Para determinar la pureza del ARN, se emplearon las relaciones de absorbancia: 260/280, que indica la contaminación por proteínas: la muestra de ARN será pura si es ≤ 1.8 y 260/230 que indica la existencia de componentes orgánicos y debe ser >1.8 .

Evaluación de la transfección transitoria mediante Q-PCR

Para definir la eficiencia de transfección en esta estandarización metodológica se evaluó la expresión génica de TMPRSS4 por RT-PCR con sondas Taqman. Para ello, el ARN se retrotranscribió para obtener cDNA a partir de entre 500 ng y 2mg totales de ARN previamente extraído y cuantificado, como se indica brevemente a continuación en la tabla 9 y 10.

Tabla 9. Preparación de la reacción de RT-PCR

Componente	Volumen
2X RT buffer mix	5 µl
20X RT enzyme mix	0.5 µl
Muestra ARN	Hasta 4.5 µl
H ₂ O libre de nucleasas	Cantidad suficiente para llegar a 10 µl
Total por reacción	10 µl

Tabla 10. Configuración de la reacción de RT-PCR

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Temperatura	37°C	95°C	4°C
Tiempo	60 min	5 min	∞

A continuación, los niveles de expresión génica de TMPRSS4 se cuantificaron con PCR en tiempo real con sondas TaqMan específicas utilizando como control normalizador GAPDH, y como control negativo una secuencia siRNA aberrante siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante el cual se describe brevemente a continuación en la tabla 11 y 12.

Tabla 11. Preparación de la reacción qPCR

Componente	Volumen por reacción
TaqMan® Universal Master Mix II, with/no UNG, 2X	5 µl
TaqMan® Assay, 20X	0.5 µl
cDNA+ agua libre de nucleasas	4.5 µl

Volumen total	10 μ l
---------------	------------

Tabla 12. Configuración de la reacción qPCR

		Activación de la polimerasa	PCR	
			40 ciclos	
Temperatura	50 °C	95 °C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min

La cuantificación de la expresión normalizada del gen TMPRSS4 se realizó con el método modificado de $2^{-\Delta Ct}$. Las diferencias en la expresión de TMPRSS4 entre las muestras transfectadas con el siRNA de interés y el control negativo se evaluaron por una prueba de T, considerando cambios significativos a aquellos con un valor de significancia menor a 0.05. Todos los experimentos se realizaron evaluando por triplicado cada sonda de expresión y por al menos dos experimentos independientes.

Ensayo de viabilidad celular por MTS

Es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. Contiene una sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio que se reduce a causa del metabolismo celular en un producto de formazán coloreado que es soluble en medio de cultivo. Esta conversión presumiblemente se logra mediante NADPH o NADH producidos por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Los ensayos se realizan agregando una pequeña cantidad del reactivo, directamente a los pozos de cultivo, incubando de 1 a 4 horas y luego registrando la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pozos. La cantidad de producto de formazán es medida por absorbancia a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Para realizar este ensayo, se usaron placas de 96 pozos, se cultivaron 20,000 células por pozo en 100 μ l de medio de cultivo y se incubaron por 24 horas a 37°C en un ambiente con 5% de CO_2 . Es importante atemperar el reactivo a temperatura ambiente antes de su

uso, para posteriormente, agregar 10 μ l a cada pozo e incubar la placa a 37°C por 1-4 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Finalmente, se registró la absorbancia a 490 nm, utilizando el equipo MultiSkan Go.

Resultados

Aprendizaje y estandarización de técnicas de cultivo y de biología molecular

Uno de los objetivos primarios de este trabajo fue realizar un entrenamiento dedicado sobre técnicas de biología molecular y cultivo celular en instalaciones dedicadas para ello. Durante el desarrollo de esta tesis se implementó una estrategia para poder realizar de forma autónoma procesos tan sencillos como el pipeteo óptimo, para asegurar de este modo resultados reproducibles y confiables, hasta técnicas más avanzadas como lo es el mantenimiento celular y procesos necesarios en el cultivo celular. Este período de aprendizaje se concluyó con técnicas de biología molecular como lo son la PCR en tiempo real.

Dicho período de entrenamiento consistió en dos fases dónde inicialmente se mostró cómo realizar el proceso y posteriormente una fase de curva de aprendizaje hasta alcanzar el correcto desarrollo de las técnicas y uso de los instrumentos, como resultado de estas actividades se adquirieron conocimientos relevantes para el desarrollo de técnicas de laboratorio que permitieron en primera instancia comenzar con las estandarizaciones planteadas de los protocolos específicos así como asegurar resultados sin sesgo técnico debido a una mala operación del evaluador.

Esto permitió fortalecer varios de los conocimientos adquiridos durante el tiempo de estudio de la carrera, así como en varias áreas que por la condición sanitaria por la que atravesamos no se habían cubierto tan ampliamente.

Determinación de concentraciones inhibitoria 50 (IC50) en los modelos celulares

En la primera parte de este trabajo, se determinó la concentración a la que los quimioterapéuticos (docetaxel, doxorubicina y paclitaxel) son capaces de inhibir la proliferación al 50%. Se emplearon tres líneas celulares, de cáncer de mama triple negativo, con el fin de representar la heterogeneidad celular en un tumor.

El primer obstáculo de trabajar con líneas celulares es que cada línea celular presenta requerimientos y características específicas por lo que se debió estandarizar el número óptimo de células a cultivar por pozo en las placas de cultivo. De esta manera evitar pérdida de las células debido a una alta confluencia en los tiempos de incubación comprometiendo los resultados y análisis. Brevemente, en la línea celular BT-549 observamos que cuando llegaba a confluencia, comenzaba a despegarse, por lo que la lectura de resultados del tratamiento no era confiable. Finalmente, se establecieron los números óptimos que nos permitieran el desarrollo del experimento sin contratiempo con las condiciones que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Número de células óptimo para el cultivo de las tres líneas celulares.

Línea celular	Número de células	
	Tratamiento a 24 hrs	Tratamiento a 72 hrs
BT-549	20,000	12,000
MDA-MB-231	35,000	17,000
MDA-MB-468	18,000	8.000

A continuación, se probaron distintas concentraciones seriales (al menos 4) de los fármacos con el fin de determinar la IC50 para cada fármaco en cada línea celular. Posteriormente, se determinó el número total de células proliferativas por tinción de cristal violeta. Se observó una heterogeneidad en las respuestas de las diversas líneas a los fármacos, esto se explica debido a las diferentes características biológicas y moleculares propias de cada modelo celular empleado. Como se observa en la tabla 14, la línea celular MDA-MB231 resultó ser la más resistente a docetaxel seguida por la línea BT549 y finalmente la línea MDA-MB468 siendo la más sensible. Para paclitaxel, el otro taxano evaluado, observamos un

comportamiento similar siendo MDA-MB231 la más resistente a la actividad de dicho fármaco. Finalmente, para la antraciclina evaluada, es decir la doxorubicina, la línea BT549 resultó ser la más resistente seguida por MDA-MB231 finalmente por MDAMB-468. No es de sorprender que este último modelo celular sea el que más responde a los fármacos evaluados, dado que tiene una biología menos agresiva e invasiva, y en general se considera un subtipo más sensible a los fármacos evaluados. Esta evaluación permitió definir la diversidad de respuestas encontradas a nivel *in vitro* y cómo estos fenotipos de respuesta podrían simular los escenarios observados en los tumores de pacientes humanos a los cuales se debe enfrentar el tratamiento clínico.

Tabla 14. Concentración inhibitoria 50, de los tres quimio fármacos probados en cada línea celular.

Línea	Quimio fármaco	Concentración(μ M)
MDAMB468	Doxorrubicina	1.34
MDAMB468	Docetaxel	3.8
MDAMB468	Paclitaxel	1.8
MDAMB231	Doxorrubicina	3.96
MDAMB231	Docetaxel	26.72
MDAMB231	Paclitaxel	11.53
BT549	Doxorrubicina	14.87
BT549	Docetaxel	18.96
BT549	Paclitaxel	9.8

Esta estandarización permitirá evaluar posteriormente el efecto del silenciamiento o la sobreexpresión exógena de ARNs exosomales y su efecto sobre la resistencia a los quimio fármacos analizados.

Silenciamiento exógeno de *TMPRSS4* mediante sistema de siRNA

Como parte inicial de la caracterización de la expresión del gen *TMPRSS4* evaluamos su expresión total en los 3 modelos celulares, se observó una diversidad en los patrones de expresión siendo la línea MDA-MB468 en la que más se expresó

y por lo tanto, representando uno de nuestros principales modelos para el estudio del silenciamiento de dicho gen (Figura 4). Cabe señalar que no se detectó expresión de este transcrito en la línea BT549.

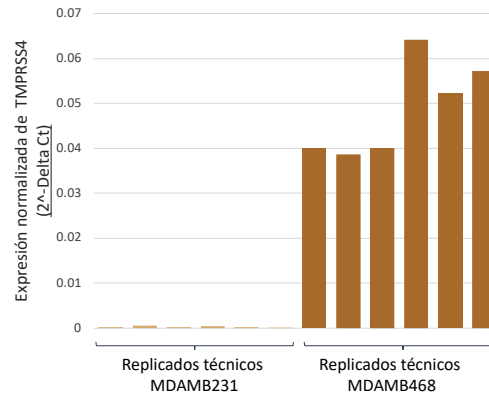


Figura 4. Representación gráfica de la expresión normalizada del gen *TMPRSS4* en dos líneas celulares: MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Determinada a partir de qPCR.

Tras realizar la transfección de una secuencia siRNA para el silenciamiento del gen *TMPRSS4* en la línea celular MDAMB468 en una concentración evaluada de 50µM se estableció que no hay cambios significativos con respecto a la condición control (Figura 5), lo que significa que se deberán de ajustar las condiciones de transfección para obtener un silenciamiento efectivo. Esto se puede mejorar a través de aumentar la eficiencia de transfección mediante el uso de una lipofectamina más adecuada o bien a través del aumento de la concentración del siRNA.

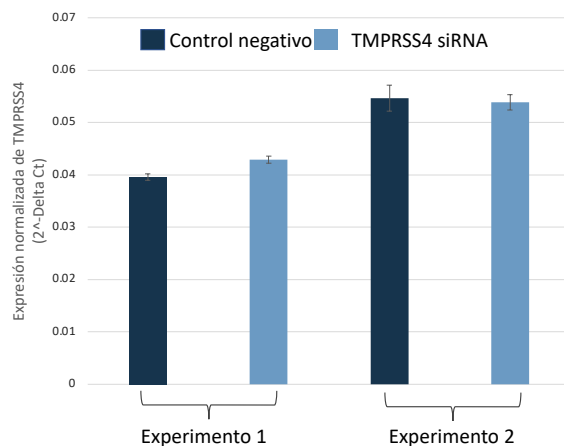


Figura 5. Representación gráfica del silenciamiento del gen TMPRSS4 a partir de la transfección transitoria del siRNA en la línea celular MDA-MB-468. No se observaron cambios significativos del tratamiento respecto al control.

La determinación de la concentración óptima tendrá que ser definida en experimentos futuros para poder realizar la evaluación funcional de este gen sobre la quimiorresistencia, particularmente en la línea MDA-MB468.

Discusión

La resistencia a fármacos quimioterapéuticos representa una de las principales barreras del éxito del tratamiento del cáncer de mama triple negativo, este proceso puede estar mediado por diversos factores, entre ellos, la comunicación celular, en la que los exosomas desempeñan un papel importante, transportando moléculas bioactivas, como ARNs.

En este trabajo, estandarizamos técnicas relevantes para el estudio *in vitro* del gen TMPRSS4 el cual podría ejercer un efecto quimio protector en tres líneas celulares triples negativas, bajo la premisa de que los ARN exosomales tienen la capacidad de conferir a las células tumorales tolerancia a la quimioterapia a través de la reprogramación transcripcional y metabólica. Este gen codifica a una serina proteasa transmembrana de tipo II, que se ha reportado desregulada en cáncer, y que facilita el desarrollo y progresión de dicho padecimiento.

Durante el desarrollo de esta estandarización se enfrentaron diversos retos concernientes tanto a la realización de los experimentos como a la diversidad de los modelos celulares empleados. Por ejemplo, durante la realización de los experimentos se detectó una falta de consistencia entre ellos debido a las técnicas de pipeteo empleadas por lo que se tuvo que poner atención en mejorar dicho proceso a través de ejercicios dedicados que permitieron al usuario mejorar su rendimiento y con ello la reproducibilidad de los experimentos. Por otro lado, se tuvo que adaptar a las condiciones de crecimiento de las diversas células las cuales variaban entre sí, siendo una de las más complejas el modo de celular BT549 por su crecimiento, puesto que inició con una tasa de proliferación muy baja lo que requirió entender cuáles eran las mejores condiciones de cultivo y tiempo para favorecer su proliferación.

Una vez estandarizadas dichas condiciones tuvimos que enfrentar nuevos retos en la estandarización experimental para definir las concentraciones IC50. Uno de los primeros aspectos que se tuvieron que estandarizar fue el número de células cultivadas, debido a que las tasas de proliferación entre las líneas celulares analizadas son diversas y pueden llegar a confluencias totales en diferentes tiempos, lo cual originó que las células se despegaran en los primeros experimentos realizados al no tener más superficie de contacto en la placa 96 pozos, esto evidentemente impactó en los resultados pues se perdían condiciones experimentales lo cual influía en la generación de resultados robustos y reproducibles. Esto se enfrentó a través de pruebas con diferentes números de células y a través de entender las tasas de duplicación de cada una de las células en las diferentes confluencias de partida, logrando con éxito definir un número adecuado para las diferentes condiciones experimentales empleadas. Estos resultados permitirán, en un futuro, tener condiciones experimentales óptimas sin sesgos que permitan el desarrollo idóneo de la evaluación funcional.

Uno de los sesgos con la metodología empleada de cristal violeta es que las métricas de conteo empleadas pueden confundir el número de divisiones que tienen

lugar durante el transcurso del ensayo y sobreestimar la concentración IC50. En particular, para los medicamentos que afectan la tasa de crecimiento y bloquean la división celular, las líneas celulares de crecimiento lento parecerán más resistentes que las líneas de crecimiento rápido, aunque el efecto biológico por división puede ser el mismo. De igual manera, uno de los sesgos más importantes a los que se enfrentan los investigadores al usar líneas celulares es la reproducibilidad entre líneas definidas con el mismo genotipo pero que presentan diversos compartimentos biológicos en cada uno de los laboratorios, incluso bajo las mismas condiciones de cultivo. Esto lo pudimos observar a través de la comparación de nuestros resultados con los reportados en la literatura y bases de datos disponibles, incluso se detectó variación entre los diversos pases celulares, por lo que es importante señalar que trabajar con pases altos, arriba de 25 no es recomendable. Por lo anterior debemos estar muy atentos en conocer el genotipo de nuestras líneas de trabajo, así como en los procesos, materiales y plásticos empleados que pudieran en parte explicar la variabilidad observada.

El desarrollo de este trabajo me permitió madurar mis habilidades en el manejo técnicas de laboratorio, protocolos de investigación y manejo de modelos celulares y técnicas de biología molecular, asimismo, los resultados de esta tesis sientan las bases para el estudio funcional de la actividad *in vitro* del gen Tmprss4, el cual ha sido previamente identificado como sobre expresado en experimentos funcionales de condicionamiento de exosomas de líneas celulares resistentes por el laboratorio receptor y reportado por la literatura como un transcrito involucrado en la resistencia a fármacos en diversos cánceres.

Con base en el entendimiento de la actividad del gen Tmprss4, creemos que su expresión, y posible transporte por vesículas extracelulares principalmente por exosomas es relevante en la respuesta a quimioterapia y en otros procesos que favorecen el desarrollo y progresión del cáncer. Esta hipótesis ha sido sustentada por diversas evidencias científicas que han demostrado que la regulación a la baja de Tmprss4 aumenta significativamente la sensibilidad a la quimioterapia (Exposito *et al.*, 2019; Tanabe & List, 2017). El dilucidar el papel de este transcrito

transferido por vías exosomales en el proceso de adquisición de resistencia a la quimioterapia, sentará las bases sobre la utilidad clínica de los ARNs exosomales en la predicción de la respuesta a terapia en los pacientes con cáncer de mama triple negativo, además de su uso como una molécula informadora del desenlace clínico de las pacientes bajo un régimen de quimioterapia neoadyuvante.

Conclusión

Con los conocimientos adquiridos en este trabajo se logró estandarizar el número de células a cultivar para tres líneas celulares: MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT-549, así como la determinación de la concentración de IC50 de dos taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) y una antraciclina (Doxorrubicina), empleadas comúnmente en el tratamiento clínico de las pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Se determinó la posible actividad de TMPRSS4 sobre la resistencia a terapia en modelos *in vitro* de cáncer de mama triple negativo. Los hallazgos de este estudio ayudarán a conocer y comprender las vías de resistencia a fármacos transmitidas por exosomas y apoyarán las bases sobre la utilidad clínica de los exosomas y de los ARNs exosomales para predecir la respuesta a la quimioterapia. Es muy importante dilucidar los mecanismos de quimiorresistencia considerando la contribución de la arquitectura subclonal y su compleja comunicación, puesto que la resistencia a la quimioterapia es un problema insatisfecho en la clínica hoy en día.

Estos resultados permitirán continuar con la investigación en torno al papel que desempeña el transcrito exosomal de TMPRSS4 en la quimiorresistencia, que constituye una de las principales barreras en el éxito del tratamiento contra el cáncer de mama triple negativo.

El entrenamiento recibido en el laboratorio receptor me permitió fortalecer mis habilidades tanto técnicas como intelectuales en la discusión de diversos aspectos científicos. Aún bajo la situación de pandemia tuve la oportunidad de hacer trabajo experimental para fortalecer mi formación académica.

Bibliografía

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Assani, G., Segbo, J., Yu, X., Yessoufou, A., Xiong, Y., Zhou, F., & Zhou, Y. (2019). Downregulation of TMPRSS4 enhances triple-negative breast cancer cell radiosensitivity through cell cycle and cell apoptosis process impairment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(12), 3679–3687. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.12.3679>
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Banerji, S., Cibulskis, K., Rangel-Escareno, C., Brown, K. K., Carter, S. L., Frederick, A. M., ... Meyerson, M. (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486(7403), 405–409. <https://doi.org/10.1038/nature11154>
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*, 19(5), 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Bergers, G., Hanahan, D., & Coussens, L. M. (1998). Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 42(7), 995–1002.
- Butt, A. J., Firth, S. M., & Baxter, R. C. (1999). The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology*, 77(3), 256–262. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00822.x>
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., & Reeves, W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(3), 661–674. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>
- Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. J. (1978). Long-term human breast

- carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911–915. <https://doi.org/10.1007/BF02616120>
- Cárdenas-Sánchez, J., Erazo Valle-Solís, A. A., Arce-Salinas, C., Bargalló-Rocha, J. E., Bautista-Piña, V., Cervantes-Sánchez, G., ... Valero-Castillo, V. (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 18(3), 141–231. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M19000180>
- Cataldo, A., Romero-Cordoba, S., Plantamura, I., Cosentino, G., Hidalgo-Miranda, A., Tagliabue, E., & Iorio, M. V. (2020). Mir-302b as a combinatorial therapeutic approach to improve cisplatin chemotherapy efficacy in human triple-negative breast cancer. *Cancers*, 12(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers12082261>
- CENETEC. (2012). Guía de Práctica Clínica GPC Prevención , Tamizaje y Referencia Oportuna de Casos Sospechosos de Cáncer de Mama en el Primer Nivel de Atención Evidencias y Recomendaciones. *Guía de Práctica Clínica*, pp. 1–71. Retrieved from <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/S-001-08/ER.pdf>
- Characteristics, G., & Conditions, C. (1992). *BT-549*. 49(0), 1–3.
- Chen, W. X., Liu, X. M., Lv, M. M., Chen, L., Zhao, J. H., Zhong, S. L., ... Tang, J. H. (2014). Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of MicroRNAs. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095240>
- Christofori, G., & Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(2), 73–76. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01343-7)
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J. P., Wolmark, N., ... Von Minckwitz, G. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*, 384(9938), 164–172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8)
- De Blander, H., Morel, A. P., Senaratne, A. P., Ouzounova, M., & Puisieux, A. (2021). Cellular plasticity: A route to senescence exit and tumorigenesis.

- Cancers*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/cancers13184561>
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>
- Exposito, F., Villalba, M., Redrado, M., de Aberasturi, A. L., Cirauqui, C., Redin, E., ... Calvo, A. (2019). Targeting of TMPRSS4 sensitizes lung cancer cells to chemotherapy by impairing the proliferation machinery. *Cancer Letters*, 453(September 2018), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.013>
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, 357(6348). <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
- Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., & Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: When and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer Journal*, 17(2), 89–95. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318212dd3d>
- Foo, J., & Michor, F. (2014). Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy. *Journal of Theoretical Biology*, 355, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.02.025>
- Galmarini, C. M., Kamath, K., Vanier-Viorner, A., Hervieu, V., Peiller, E., Falette, N., ... Dumontet, C. (2003). Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *British Journal of Cancer*, 88(11), 1793–1799. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600960>
- Goh, C. Y., Wyse, C., Ho, M., O’Beirne, E., Howard, J., Lindsay, S., ... McCann, A. (2020). Exosomes in triple negative breast cancer: Garbage disposals or Trojan horses? *Cancer Letters*, 473(September 2019), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.046>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... Cardoso, F. (2019). Breast cancer. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hayflick, L. (1998). A Brief History of the Mortality and Immortality of Cultured Cells. *Keio Journal of Medicine*, 47(3), 174–182. <https://doi.org/10.2302/kjm.47.174>
- INEGI. (2020). COMUNICADO DE PRENSA NÚM . 462 / 20 15 DE OCTUBRE DE 2020 ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE) tumores malignos son por cáncer de mama . En 2018 se registran 314 499 defunciones femeninas : 44 164.
- INEGI. (2021). *Estadísticas a propósito de la lucha contra el cáncer de mama, Comunicado de prensa Núm. 571/21 18 de Octubre de 2021.* (2020), 1–5. Retrieved from https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUC HACANCER2021.pdf
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes and Development*, 23(5), 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
- Jones, R., & Zweier. (2014). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002.TGF->
- Kennedy, K. M., & Dewhirst, M. W. (2010). Tumor metabolism of lactate: The influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncology*, 6(1), 127–148. <https://doi.org/10.2217/fon.09.145>
- Kim, S., Ko, D., Lee, Y., Jang, S., Lee, Y., Lee, I. Y., & Kim, S. (2019). Anti-cancer activity of the novel 2-hydroxydiarylamide derivatives IMD-0354 and KRT1853 through suppression of cancer cell invasion, proliferation, and survival mediated by Tmprss4. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46447-7>
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits

- of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70.
<https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Lakshmi, S., Hughes, T. A., & Priya, S. (2021). Exosomes and exosomal RNAs in breast cancer: A status update. *European Journal of Cancer*, 144, 252–268.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.11.033>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767.
<https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Li, X. M., Liu, W. Lou, Chen, X., Wang, Y. W., Shi, D. B., Hui, Z., ... Gao, P. (2017). Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(4), 927–935. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2893>
- Ozawa, P. M. M., Alkhalaiwi, F., Cavalli, I. J., Malheiros, D., de Souza Fonseca Ribeiro, E. M., & Cavalli, L. R. (2018). Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 172(3), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4925-5>
- Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Soto-Perez-de-Celis, E., Arce-Salinas, C., Matus-Santos, J., Ramírez-Ugalde, M. T., ... Mohar, A. (2017). Clinical and epidemiological profile of breast cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 757–764.
<https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007377>
- Saghafinia, S., Homicsko, K., Di Domenico, A., Wullschleger, S., Perren, A., Marinoni, I., ... Hanahan, D. (2021). Cancer cells retrace a stepwise differentiation program during malignant progression. *Cancer Discovery*, 11(10), 2638–2657. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1637>
- Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., & Swartz, M. A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 328(5979), 749–752.

<https://doi.org/10.1126/science.1185837>

- Silva, A., Cervantes S, G., Delgadillo, F., & Erazo-Valle, A. (2011). Respuestas patológicas completas obtenidas con cuatro ciclos de docetaxel más epirubicina como tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama loco-regionalmente avanzado. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 10(2), 65–70.
- Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). Los principios básicos de la herencia. In *Biología*. Retrieved from <http://latinoamerica.cengage.com>
- Stefanius, K., Servage, K., & Orth, K. (2021). Exosomes in cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 66(Figure 1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.018>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Tanabe, L. M., & List, K. (2017). The role of type II transmembrane serine protease-mediated signaling in cancer. *FEBS Journal*, 284(10), 1421–1436. <https://doi.org/10.1111/febs.13971>
- Wahba, H. A., & El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biology and Medicine*, 12(2), 106–116. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030>
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*, 25(2), 85–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>
- Xiao, H., Zhang, Z., Peng, D., Wei, C., & Ma, B. (2021). Type II transmembrane serine proteases 4 (TMPRSS4) promotes proliferation, invasion and epithelial–mesenchymal transition in endometrial carcinoma cells (HEC1A and Ishikawa) via activation of MAPK and AKT. *Animal Cells and Systems*, 25(4), 211–218. <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.1944311>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>

Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discovery*, 9(7), 837–851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>

Zaharia, M., & Gómez, H. (2014). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(4), 2–8. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2013.304.247>