



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MODALIDAD TRADICIONAL

PROYECTO DE TESIS

**“EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DE RESPUESTA
A COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS EN UN MODELO DE
CÁNCER MURINO”**

QUE PRESENTA

M. en C. Cynthia Guadalupe Ramírez Farías

PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Dr. José Correa Basurto

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez

AGUASCALIENTES, AGS., MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2025

Fecha de dictaminación (dd/mm/aaaa): 28 de noviembre de 2025

NOMBRE: Cynthia Guadalupe Ramírez Farías ID 66576

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional LGAC (del posgrado): Estudio de Proteínas en Sistemas Biológicos

MODALIDAD DEL PROYECTO DE GRADO: Tesis (X) *Tesis por artículos científicos () **Tesis por Patente () Trabajo Práctico ()

TÍTULO: Evaluación histopatológica y molecular de respuesta a compuestos anticancerígenos en un modelo de cáncer murino

El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad en mujeres a nivel mundial y representa un serio problema de salud pública, especialmente en México y Latinoamérica. El trabajo se centró en estudiar los efectos del compuesto HO-AAVPA, un inhibidor selectivo de la enzima HDAC1, el cual ha mostrado propiedades antitumorales y antifibróticas. Su evaluación en un modelo de cáncer murino triple negativo permitió identificar cambios histológicos y moleculares asociados a la reducción del crecimiento tumoral y la modulación del microambiente estromal, lo que sugiere un potencial uso como agente anticancerígeno con menor toxicidad que los tratamientos tradicionales. Este hallazgo contribuye al diseño de fármacos más específicos que podrían mejorar la eficacia terapéutica y disminuir los efectos secundarios en las pacientes.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SEGÚN CORRESPONDA: SI, NO, NA (No Aplica)

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Posgrados
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial
NA	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario (En caso de que corresponda)
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU de la SECIHTI actualizado
SI	Tiene el o los artículos aceptados o publicados y cumple con los requisitos institucionales (en caso de que proceda)
*En caso de Tesis por artículos científicos publicados (completar solo si la tesis fue por artículos)	
	Aceptación o Publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto según el nivel del programa
	El (la) estudiante es el primer autor(a)
	El (la) autor(a) de correspondencia es el Director (a) del Núcleo Académico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
**En caso de Tesis por Patente	
	Cuenta con la evidencia de solicitud de patente en el Departamento de Investigación (anexarla al presente formato)

Con base en estos criterios, se autoriza continuar con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Si ☒ x
No ☐

Elaboró:

FIRMAS

*NOMBRE Y FIRMA DEL(LA) CONSEJERO(A) SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dr. Daniel Cervantes García

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NA de la LGAC correspondiente distinto al director o miembro del comité tutorial asignado por el Decano:

NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE POSGRADO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en. C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 24 fracción V del Reglamento General de Posgrado, que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Proponer criterios y mecanismos de selección, permanencia, egreso y titulación de estudiantes para asegurar la eficiencia terminal y la titulación y el Art. 28 fracción IX, atender, asesorar y dar el seguimiento del estudiantado desde su ingreso hasta su titulación.

CARTA DE VOTO APROBATORIO

Mtro. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

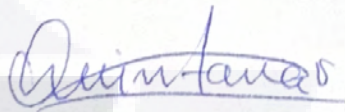
Por medio del presente como DIRECTOR designado del estudiante CYNTHIA GUADALUPE RAMÍREZ FARÍAS con ID 66576 quien realizó la tesis titulado/a: EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DE RESPUESTA A COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS EN UN MODELO DE CÁNCER MURINO, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de noviembre de 2025.



Dr. Andrés Quintanar Stephano
Director de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Mtro. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como CO-DIRECTOR designado del estudiante CYNTHIA GUADALUPE RAMÍREZ FARÍAS con ID 66576 quien realizó la tesis titulado/a: EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DE RESPUESTA A COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS EN UN MODELO DE CÁNCER MURINO, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de noviembre de 2025.

Dr. José Correa Basurto
Co-director de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Mtro. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

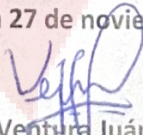
Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante CYNTHIA GUADALUPE RAMÍREZ FARÍAS con ID 66576 quien realizó la tesis titulado/a: EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DE RESPUESTA A COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS EN UN MODELO DE CÁNCER MURINO, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de noviembre de 2025.


Dr. Javier Ventura Juárez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado



biomedicines

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

The certificate of acceptance for the manuscript (**biomedicines-3944321**) titled:
N-(2-Hydroxyphenyl)-2-Propylpentanamide Modulates HDAC1 and GPER1 Expression in a Rodent Model of
Triple-Negative Breast Cancer

Authored by:

Cynthia Ramírez-Farías; Javier Ventura-Juárez; Argelia Calvillo-Robledo; Manuel Enrique Ávila-Blanco;
Daniel González-Blas; José Correa-Basurto;
Andrés Quintanar Stephano

was accepted in *Biomedicines* (ISSN 2227-9059) on 11 November 2025



Basel, November 2025

S. Tochev

Stefan Tochev
Chief Executive Officer

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Dr. Andrés Quintanar Stephano y Dr. José Correa Basurto, por su guía, paciencia y exigencia académica. Gracias por impulsarme a fortalecer mi pensamiento crítico y por acompañarme con compromiso en cada etapa de este trabajo.

A mi asesor, Dr. Javier Ventura Juárez, por su orientación cercana, su confianza y su constante apoyo. Su experiencia y disposición marcaron una diferencia profunda en el rumbo y la calidad de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio —Argelia, Yessi, Fer, Verito y Pau— gracias por las horas compartidas, por el trabajo en equipo, las pláticas, los aprendizajes y las risas que ayudaron a hacer este camino más llevadero.

A mi familia, mi mayor fuerza y motivo. A mis padres, Martha y José Luis, por su amor infinito, por enseñarme a luchar por mis sueños y por acompañarme con paciencia y fe inquebrantable.

A mis hermanos, Carlos y Toño, por su respaldo constante, su compañía y por recordarme que nunca camino sola.

A mis sobrinos Fer, Vanessa, Renata y Mateo, y a mi cuñada Griss, gracias por su cariño, su alegría y esa luz que solo la familia puede brindar.

A mis mejores amigos, Jake, Omar y Armi, gracias por su apoyo incondicional, por escucharme y por hacerme reír en los momentos más importantes; su amistad ha sido un sostén invaluable.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por el apoyo otorgado durante mi formación mediante la beca doctoral 7616065.

A todas las personas que, de una u otra forma, formaron parte de este proceso, gracias por su apoyo, su tiempo y su presencia. Este logro es también suyo.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. Cáncer	6
3.1.1. Cáncer de mama (CM).....	7
3.2. Epidemiología	8
3.3. Cáncer de mama triple negativo (CMTN).....	9
3.4. Etiología.....	10
3.5. El estroma mamario y sus implicaciones en cáncer	11
3.5.1. Fibroblastos asociados a cáncer (FACs)	13
3.5.2. Fibroblastos asociados a cáncer en cáncer de mama (FACMs).....	14
3.5.3. Papel de los FACs en la resistencia a tratamientos	17
3.6. Epigenética	19
3.6.1. Histona desacetilasas (HDACs)	20
3.6.2. Histona desacetilasa 1 (HDAC1).....	21
3.6.3. Blancos terapéuticos dirigidos a la epigenética de FACMs	23
3.6.4. Inhibidores de HDACs	24
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. HIPOTESIS.....	30
6. OBJETIVO GENERAL	30
7. OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
8. METODOLOGÍA	30
8.1. Síntesis del N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)	30
8.2. Purificación de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)	31
8.3. Caracterización química de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)....	31
8.4. Inducción de cáncer mamario triple negativo	31
8.5. Tratamientos.....	32
8.6. Histología.....	32
8.7. Inmunofluorescencia	33
8.8. Western Blot	33
8.8.1. Extracción de proteínas.	33
8.8.2. Cuantificación de proteínas.....	34
8.8.3. Inmunoblotting	34
8.9. Análisis estadístico.	35
9. RESULTADOS.....	35

9.1.	Caracterización de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)	35
9.1.1.	Espectroscopia de infrarrojo (IR).....	36
9.1.2.	Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³ C).....	37
9.1.3.	Espectrometría de masas	38
9.2.	Evaluación del efecto de HO-AAVPA en el volumen tumoral	38
9.3.	Evaluación del efecto de HO-AAVPA en el estroma tumoral.....	40
9.4.	Cambios morfológicos de tejido hepático en respuesta a VPA y HO-AAVPA.....	41
9.5.	Cambios en la fibrosis del estroma tumoral por efecto de VPA y HO-AAVPA	42
9.6.	Efecto de VPA y HO-AAVPA en la expresión de HDAC1 y α -SMA en tejido tumoral.....	45
9.7.	Efecto de VPA y HO-AAVPA en la expresión de colágeno 1 y GPER.....	48
10.	DISCUSIÓN	48
10.1.	Síntesis, purificación y caracterización del compuesto HO-AAVPA	48
10.2.	Evaluación del efecto de VPA e HO-AAVPA en el tejido tumoral.....	49
10.3.	Cambios en el parénquima hepático en respuesta a HDACi.	49
10.4.	Expresión de HDAC1 y α -SMA en respuesta a HO-AAVPA y VPA	50
10.5.	Cambios en la fibrosis intratumoral en respuesta a tratamientos con HDACi	50
10.6.	Efecto de HO-AAVPA en la expresión de GPER1	51
11.	CONCLUSIONES.....	51
12.	REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Vías de señalización por las que la MEC participa en la progresión tumoral.	12
Tabla 2.	Subpoblaciones de FACs y sus características.....	16
Tabla 3.	Mecanismos de inducción de resistencia a quimioterapéuticos mediada por FACs. .	18
Tabla 4.	<i>Efectos biológicos múltiples de los inhibidores de las histona-desacetilasas.</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Características de una célula cancerosa..	7
Figura 2.	Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial..	8
Figura 3.	Incidencia y mortalidad por cáncer a en México.....	9
Figura 4.	Factores de riesgo del cáncer de mama triple negativo.	11
Figura 5.	La estructura del microambiente celular y el diverso origen de los FACs..	14
Figura 6.	Mecanismos implicados en la resistencia a fármacos..	17
Figura 7.	Papel de las HDAC en la regulación de la reparación del ADN.....	23

Figura 8. Clasificación general de inhibidores de la HDAC.....	25
Figura 9. Interacciones de diversos compuestos aril derivados de VPA, incluido el N-(2-hidroxifenil)-2- propilpentanamida.	28
Figura 10. Ruta sintética de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA).....	31
Figura 11. Análisis de espectroscopia de infrarrojo (IR) de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.	36
Figura 12. Espectro de RMN ¹³ C de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida	37
Figura 13. Análisis de espectrometría de masas. Peso molecular experimental= 236.1684 ...	38
Figura 14. Desarrollo tumoral del grupo control.....	39
Figura 15. Cambios en el volumen tumoral..	39
<i>Figura 16. Cambios estromales y morfológicos en respuesta a HO-AAVPA.</i>	<i>41</i>
Figura 17. Cambios morfológicos en el tejido hepático..	42
Figura 18. Evaluación de fibrosis tumoral.....	44
<i>Figura 19. Evaluación del efecto de HO-AAVPA y VPA en la fibrosis tumoral.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 20. Expresión de HDAC1 y α-SMA en una muestra tisular.....</i>	<i>46</i>
Figura 21. Número de células que expresan HDAC1 en tejido tumoral.....	47
Figura 22. Número de células que expresan α-SMA en tejido tumoral.....	47
Figura 23. Expresión de GPER1 y COL1 analizada por Western blot en tejido tumoral..	48

1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por alteraciones epigenéticas que modifican la expresión génica sin cambios en la secuencia del ADN. Entre los mecanismos epigenéticos más relevantes destacan las modificaciones postraduccionales de histonas, reguladas por enzimas como las histona desacetilasas (HDACs), cuya actividad aberrante favorece una cromatina más compacta y la represión de genes implicados en la homeostasis celular. Paralelamente, la matriz extracelular (ECM) y sus componentes fibrilares, particularmente el colágeno tipo I, desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral al influir en la rigidez tisular, la señalización mecanotransductiva y la capacidad invasiva de las células malignas. En este contexto, el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER1) ha surgido como un modulador crítico del microambiente tumoral debido a su capacidad para regular la proliferación celular, la apoptosis y la síntesis de ECM. El presente trabajo evaluó la interacción entre la inhibición de HDACs, la remodelación de la ECM y la modulación de GPER1 en modelos tumorales experimentales. Se realizaron análisis histológicos, cuantificación de colágeno, evaluación de la expresión génica y proteica, así como determinación de la actividad de HDACs. Los resultados demostraron que la inhibición epigenética induce modificaciones estructurales en el tejido tumoral, reduce la proliferación celular, altera la deposición de colágeno e impacta la expresión de GPER1, sugiriendo una relación funcional entre estos procesos. En conjunto, los hallazgos destacan el papel integrador de la regulación epigenética y del microambiente tumoral en la progresión del cáncer, y respaldan el potencial terapéutico de los inhibidores de HDAC como moduladores de la ECM y de vías de señalización asociadas a GPER1.

2. ABSTRACT

Cancer progression involves complex epigenetic mechanisms that regulate gene expression independently of DNA sequence alterations. Among these mechanisms, histone deacetylases (HDACs) are essential modulators of chromatin architecture, and their dysregulated activity promotes transcriptional repression and facilitates oncogenic transformation. Concurrently, the extracellular matrix (ECM), particularly fibrillar components such as type I collagen, exerts a significant influence on tumor behavior by modifying tissue stiffness, affecting mechanotransduction pathways, and enhancing invasive and metastatic potential. Within this framework, the G protein–coupled estrogen receptor (GPER1) has emerged as a relevant mediator of tumor–microenvironment interactions, given its involvement in cellular proliferation, apoptosis, and ECM remodeling. This doctoral research investigated the interplay between HDAC inhibition, ECM modulation, and GPER1 expression in experimental tumor models. Comprehensive analyses—including histopathological evaluation, collagen quantification, gene and protein expression profiling, and HDAC activity assays—were conducted to determine the biological consequences of epigenetic modulation on tumor progression. HDAC inhibition led to marked histological alterations, reduced proliferative activity, and significant changes in collagen deposition. Furthermore, HDAC modulation influenced GPER1 expression, suggesting that epigenetic regulation may intersect with estrogen-related signaling pathways within the tumor microenvironment. Overall, the findings reveal a functional association between chromatin remodeling, ECM dynamics, and GPER1-mediated signaling. These results underscore the therapeutic relevance of HDAC inhibitors as agents capable not only of modifying gene expression but also of reshaping the structural and signaling landscape of the tumor microenvironment. The study contributes to a deeper understanding of the epigenetic–microenvironmental axis in cancer and supports the exploration of combined strategies targeting HDACs and GPER1 for advanced oncological interventions.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer

Una neoplasia (o tumor) es una masa de tejido anormal con un crecimiento prácticamente autónomo que excede al de los tejidos normales. Las neoplasias pueden ser benignas o malignas y su nomenclatura se basa en las características de su presunto origen histogenético. Respecto a los tumores malignos, estos reciben la denominación de cáncer y se dividen en 2 categorías generales: I) Carcinomas, que se originan de células epiteliales; II) Sarcomas, que se originan de células mesenquimales (Mitchell, Kumar, Abbas, & Aster, 2017). El cáncer surge de una serie de cambios genéticos (mutaciones) y epigenéticos, que usualmente involucra proteínas asociadas al ADN que influyen en la expresión génica y que dan a la célula cancerosa su comportamiento maligno, los cambios en los genes responsables de la carcinogénesis pueden ser heredados o ser adquiridos *de novo* (mutaciones somáticas), generalmente producto de la exposición a sustancias del ambiente o conductuales, como la radiación ultravioleta o productos químicos en el humo del tabaco, o agentes biológicos como algunos virus (Weitzel, Blazer et al. 2011, Mitrus, Bryndza et al. 2012, Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva 2019).

Para que estas mutaciones iniciadoras o promotoras de tumores logren persistir en una célula y dar origen a un clon tumoral, a nivel de la célula y su microambiente deben darse dos eventos fundamentales, que son comunes a todos los tipos de tumor: la inestabilidad genómica que favorece la adquisición de mutaciones y la inflamación tumorigénica (Sánchez 2013). En el desarrollo tumoral las células adquieren una serie de características que les ayudan a sobrevivir, proliferar, invadir y crecer, estos cambios incluyen la inmortalidad replicativa permitida, inducción de la angiogénesis, resistencia a la muerte celular, señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, activación de la invasión y metástasis (Figura 1). Otras dos características etiquetadas como emergentes involucran la capacidad para modificar, o reprogramar, el metabolismo celular con el fin de apoyar más eficazmente la proliferación neoplásica, y la otra permite a las células cancerosas evadir la destrucción inmunológica, en particular por linfocitos T y B, macrófagos y células natural killers (Hanahan and Weinberg 2011).



Figura 1. Características de una célula cancerosa. Tomada de Sánchez, Rev. Med. Clin. Condes, 2013.

3.1.1. Cáncer de mama (CM)

El cáncer mamario (CM) es una neoplasia de desarrollo y progresión heterogénea (Ng, Ong et al. 2017), debido a que el proceso invasivo está asociado a una variedad de alteraciones moleculares, dichas alteraciones conducen a diferentes subtipos de la enfermedad (Claude-Taupin, Boyer-Guittaut et al. 2015). Así, el cáncer de mama se clasifica en:

- a) Tumores mamarios tipo Luminal A y Luminal B, los cuales representan el 50% de todos los CM, están relacionados con un buen pronóstico ya que expresan receptores estrogénicos (ER), los cuales están relacionados con la proliferación, supervivencia y capacidad invasiva celular (Mohamed, Krajewski et al. 2013), y son empleados como blancos terapéuticos.
- b) Los cánceres de mama HER2⁺, que sobreexpresan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), estos tumores no poseen receptores de estrógenos (ER negativos), lo que los diferencia de los Luminal B, haciendo las terapias hormonales ineficientes (Claude-Taupin, Boyer-Guittaut et al. 2015).
- c) Cáncer de mama triple negativo (CMTN), los cuales son negativos a receptor a estrógeno (RE) y receptor a progesterona (PR), con la expresión de proteína HER- 2 normal, están asociados a un mal pronóstico (Prat, Parker et al. 2010, Claude- Taupin, Boyer-Guittaut et al. 2015).

3.2. Epidemiología

Actualmente el cáncer de mama es el cáncer femenino más común entre mujeres en etapa reproductiva (>20 años), con una incidencia de más de 2 millones de nuevos casos, lo que representa el 26.7% y con una prevalencia de 6.5 millones (31.6%) de todos los cánceres en mujeres a nivel mundial, con una mortalidad de 569 mil muertes en 2018 (Sung et al., 2020; Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva 2019) (Figura 2).

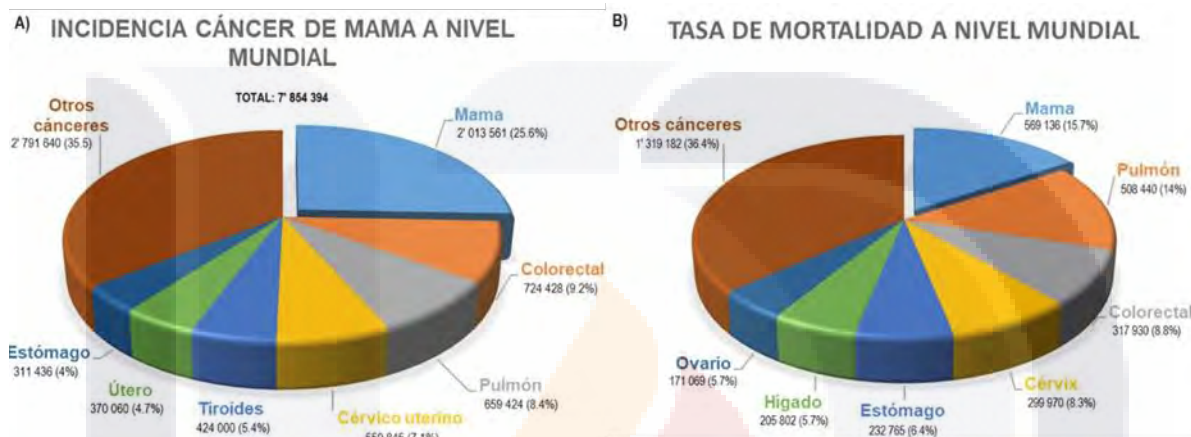


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. A) se muestra la incidencia de los diversos tipos de cáncer, destacando el cáncer de mama con un 25.6% en mujeres >20 años a nivel mundial. B) se observa la elevada tasa de mortalidad por estas patologías, de la cual el 15.7% corresponde a cáncer de mama. Adaptada de GLOBOCAN, 2020.

En México, 50 de cada 100 mil mujeres mayores de 20 años padece cáncer de mama, en el año 2018 se han reportado más de 219 mil nuevos casos de cáncer de mama (29%), con una mortalidad de más de 50 mil muertes en mujeres mayores de 20 años (16.9%) (Sung et al., 2020; Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva 2019). De manera general, únicamente en el cáncer de mama y en el de células germinales las tasas de mortalidad de las mujeres son superiores a las de los hombres (Fig. 3).

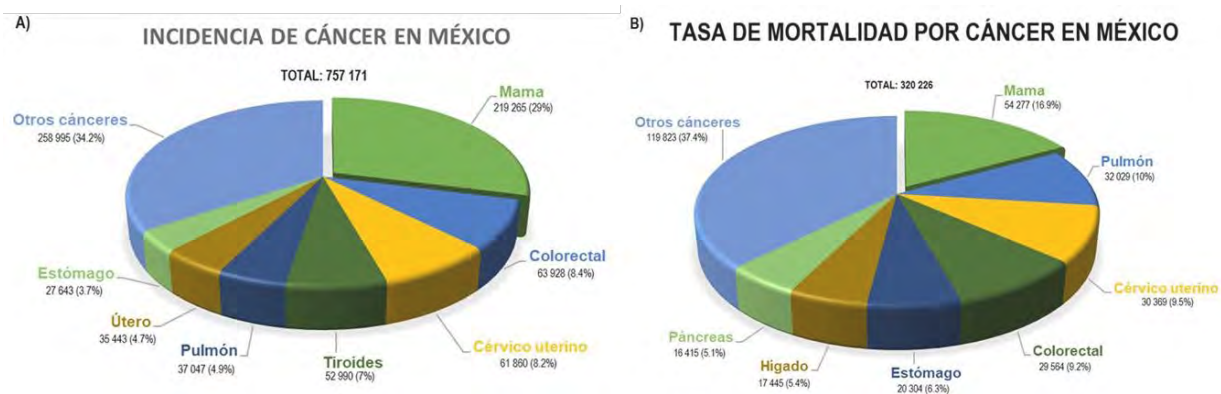


Figura 3. Incidencia y mortalidad por cáncer en México. A) se muestra la incidencia de los diversos tipos de cáncer, destacando el cáncer de mama con un 29% en mujeres >20 años a nivel mundial. B) La elevada tasa de mortalidad por procesos cancerosos, de los cuales el 16.9% de las muertes es debido a cáncer de mama. Adaptada de GLOBOCAN, 2020.

3.3. Cáncer de mama triple negativo (CMTN)

Considerado el subtipo más agresivo y peligroso, debido a su complejidad y resultados terapéuticos deficientes. Dentro de este subgrupo, el 70% representa tumores basaloides (Dogu, Ozkan et al. 2010), los cuales presentan un perfil epidemiológico diferente, ya que se presentan con mayor frecuencia en mujeres afroamericanas y latinas, que en caucásicas (Carey, Perou et al. 2006). Comparado con otros subtipos de cáncer mamario, como el dependiente de hormonas, la conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a desarrollar metástasis, predominando las metástasis viscerales a hígado, pulmón y sistema nervioso central, asimismo, el curso clínico es más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte (Dent, Trudeau et al. 2007).

El CMTN presenta una conducta biológica diferente, su epidemiología aún no está clara (National Comprehensive Cancer Network 2018). Además, representa un reto para los oncólogos clínicos, ya que, a pesar de la alta tasa de resultados iniciales favorables cortos y un desarrollo de mecanismos de resistencia precoz, siendo esta una paradoja del CMTN (Carey, Dees et al. 2007). Por otro lado, estos tumores no responden a la terapia endocrina y no existe una terapia blanco eficaz disponible (Zaharia and Gomez 2013).

El CMTN es altamente heterogéneo ya que se obtienen resultados diferentes al mismo tratamiento anticancerígeno, lo cual deriva a análisis moleculares de los perfiles de ARN mensajero de este subtipo, permitiendo subclasificarlo de la siguiente manera: 1) Tipo basal con una mayor frecuencia que va del 71-91% de los casos de CMTN; 2) el segundo grupo con mayor frecuencia presenta una baja expresión de Claudina (*Low-Claudin*), con una frecuencia

del 30%, 3) el HER-2 enriquecido, es menos frecuente, 4) el luminal A y luminal B, que son tumores con expresión normal de receptores, con un 9, 5, 6 y 1% de los casos de CMTN respectivamente (Oakman, Viale et al. 2010, Perou 2010, Prat, Adamo et al. 2013).

En la población latina, CMTN presenta una alta incidencia; los registros en México, indican una frecuencia del 23,1% (Vallejos, Gomez et al. 2010, Lara-Medina, Perez-Sanchez et al. 2011, Márquez, Lacruz et al. 2012). Otros datos indican que las tasas más altas de CMTN ocurren en mujeres jóvenes y que podrían estar asociados con una mayor probabilidad de mutación en el gen BRCA1 (Foulkes, Stefansson et al. 2003).

3.4. Etiología

Al igual que el cáncer de mama dependiente de hormonas, se considera al CMTN una patología de origen multifactorial sin embargo, sus factores de riesgo aún no están identificados con precisión, lo que dificulta el implementar estrategias de prevención e intervención claras, se ha encontrado que, la gestación juega un papel de riesgo importante, tal como se describió por Phipps y colaboradores (2011), quienes señalan que las mujeres que llevaron a término 3 o más embarazos tenían 1.4 veces más riesgo de desarrollar CMTN, sin embargo, las mujeres multíparas tuvieron 22% menos riesgo de padecer cáncer dependiente de hormonas (Phipps, Chlebowski et al. 2011). La relación de la obesidad con el elevado riesgo de desarrollar cáncer dependiente de hormonas, proviene de la asociación de la conversión (aromatización) de los depósitos adiposos a estrógenos (Calle and Kaaks 2004). Dado que el CMTN no es dependiente de hormonas, su relación con el sobrepeso no ha sido esclarecida. Pieboron y Frankenfeld (2013), realizaron una revisión sistemática de once estudios epidemiológicos que incluyeron a más de 24 mil pacientes con cáncer de mama. Encontrando que las mujeres premenopáusicas y obesas tienen 1,4 veces el riesgo de enfermar de un CMTN (Pierobon and Frankenfeld 2013). Otro estudio realizado con más de 140 mil mujeres mostró que no existía asociación entre el fenotipo triple negativo con el consumo de alcohol o tabaco, pero sí una asociación sugerente entre el consumo de alcohol y tabaco con los tumores de mama dependientes de hormonas (Kabat, Kim et al. 2011) (Figura 4).

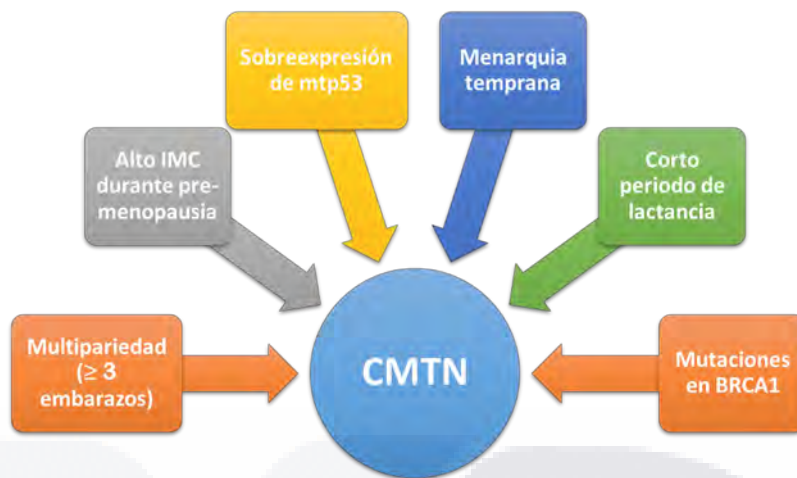


Figura 4. Factores de riesgo del cáncer de mama triple negativo. Adaptado de Calle y Kaaks, 2004; Kabat, Kim et al., 2011; Pierboron y Frankenfeld, 2013.

3.5. El estroma mamario y sus implicaciones en cáncer

Una gran variedad de los tejidos corporales está constituidos por un epitelio que se asocia con un estroma; éste comprende una variedad de componentes proteicos de la matriz extracelular (MEC) como proteoglicanos, ácido hialurónico, fibronectina, colágeno y laminina; componentes celulares como adipocitos, fibroblastos, células endoteliales, neuronales e inmunes, además de varios factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, anticuerpos, y metabolitos (Cunha, 2008; Kalluri & Zeisberg, 2006; Puri & Hebrok, 2010; Wiseman & Werb, 2002).

La organización de una glándula mamaria adulta conserva la estratificación de las capas celulares y MEC en la arborización de los lóbulos y ductos que componen la mama. La capa de células mioepiteliales que rodean el epitelio mamario, compuesto por células productoras de leche y células laminales, son responsable de crear y mantener la membrana basal; ésta es una estructura extremadamente densa aunque delgada (0.2 mm) compuesta por proteoglicanos, colágena IV, lamininas, fibronectina y tenacina, la cual está rodeada por una MEC estromal compuesta principalmente por colágeno I (Polyak & Kalluri, 2010). La MEC no sólo da soporte a la estructura de la mama, funciona como un puente en la comunicación entre el epitelio y su microambiente durante el desarrollo del tejido (Bissell, Hall, & Parry, 1982; L. Li et al., 2017)

Las alteraciones histológicas en el estroma y en tejido adyacente a lesiones malignas, conocidas como desmoplasia, pueden presentar características diversas como un estroma celular predominantemente celular y poca matriz hasta un mínimo contenido celular y un

máximo de matriz (Tlsty & Coussens, 2006; Walker, 2001).

La relación entre la biología estromal, el desarrollo y progresión tumoral fue establecida fuertemente por Boyd y colaboradores (2002), quienes encontraron un aumento de 2-6 veces en la susceptibilidad de padecer cáncer de mama en mujeres con una elevada densidad mamaria (mamografía), y altos niveles de IGF-1 y TIMP-3 (Boyd et al., 2002). Martín y Boyd (2008) relacionaron el aumento en la densidad mamográfica con un aumento en el número de células y deposición de colágeno en el estroma mamario, siendo más significativa la correlación con la deposición de colágeno (Martin & Boyd, 2008). Se ha demostrado, además, que los tumores surgen más frecuentemente en zonas de mayor densidad, en tejidos mamarios heterogéneos (T. Li et al., 2005; Ursin, Hovanessian-Larsen, Parisky, Pike, & Wu, 2005).

El crecimiento y la migración celular también son regulados positivamente por la rigidez de la matriz, esto sucede mediante dos vías una mecanosensorial (propiedades biofísicas) por la tensión extracelular (Calvo et al., 2013; Dupont et al., 2011; G. Hu, Li, & Xu, 2017; Levental et al., 2009; Swift et al., 2013) y por una vía bioquímica basada en la organización precisa de los ligandos en la matriz para integrar señales complejas de una forma ordenada (Barcus, Keely, Eliceiri, & Schuler, 2013; G. Hu et al., 2017; Malanchi et al., 2011; Zhang et al., 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Vías de señalización por las que la MEC participa en la progresión tumoral.

	Vía de señalización	Evento iniciador	Modulador (es)	Efecto a nivel estromal/celular
Señalización biofísica	ERK	Dureza de la MEC/Agrupamiento de integrinas	EGF	Aumento en el ensamblaje de adhesiones focalizadas (Rho), malignización celular
	YAP/TAZ (no HIPPO/LATS)	Rigidez de la matriz	YAP/Rho GTPasa/Tensión en el citoesqueleto	Activación de la vía de PI3K: Regulación de la capacidad invasiva y progresión tumoral
	SRF	Cambios en elasticidad tisular	Laminina A/YAP/SRF	Regulación de ANLN y DIAPH3 (reguladores de citoesqueleto): Mantienen la rigidez de MEC.
Señalización bioquímica				Traslocación del receptor de ácido retinoico al núcleo, aumento en la síntesis de laminina
	Wnt	Sobreexpresión de periostina en tejido secundario	Periostina/ligandos Wnt	Mantenimiento de las células madre cancerosas, inducción de metástasis.
	ERK	Activación de receptor a Col1 (DDR2)	SNAIL1/ ERK2	Reclutamiento de ligandos de Wnt induciendo la vía de señalización
		Rigidez de la matriz	Prolactina/SRC/FAK/pERK1-2	Acumulación de SNAIL1 en núcleo, promoción de la capacidad invasora y migración celular
				Aumento de la expresión y actividad de MMP-2

Diversos componentes de la MEC, entre ellos el colágeno fungen como un andamio que favorece la migración y metástasis de células tumorales, sin embargo, su función va más allá de lo mecánico y estructural. Los cambios químicos y mecánicos en el microambiente celular, afectan en primera instancia al metabolismo celular (Kamel et al., 2014). Es bien sabido que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las células cancerosas regulan al alta la glucólisis aeróbica (Efecto Warburg) con el fin de obtener energía de una forma más rápida y acelerar su proliferación (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009) y que el metabolismo de las células tumorales se modifica dependiendo sus necesidades y las de su microambiente (Choi, Kim, Jung, & Koo, 2013; Gordon et al., 2015; Xie et al., 2014) Un estudio realizado por Dupuy y colaboradores (2015) mostró la necesidad de cambios diferenciales en el perfil metabólico de las células del mismo tumor primario con el fin de conseguir colonizar exitosamente otros órganos (Dupuy et al., 2015). Se ha encontrado además un aumento de la fosforilación oxidativa en células tumorales en circulación con respecto a las células del tumor primario (LeBleu et al., 2014)

A pesar de que la influencia del microambiente tumoral en el metabolismo de las células tumoral aún no ha sido establecida por completo, diversos estudios indican que los cambios estromales pueden aumentar el metabolismo, favoreciendo la metástasis y proliferación celular mediante alteraciones en la densidad del colágeno en MEC. Morris y colaboradores (2016) realizaron un estudio en líneas celulares de carcinoma mamario encontrando que a una mayor densidad de colágeno se favorece una morfología celular aberrante y una reprogramación del metabolismo permitiendo que la célula tumoral se adapte a su entorno y es posible que la matriz extracelular sea internalizada y degradada para funcionar como combustible en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Morris et al., 2016).

3.5.1. Fibroblastos asociados a cáncer (FACs)

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante del estroma tumoral. En condiciones fisiológicas, sus funciones incluyen la deposición y remodelación de la matriz extracelular (MEC) mediante la síntesis de componentes estructurales y el control de su recambio a través de proteasas (Arendt et al., 2010; Kalluri & Zeisberg, 2006).

En el microambiente tumoral, estos fibroblastos adquieren un fenotipo activado, conocido como miofibroblasto, que constituye la población predominante de los fibroblastos asociados a cáncer (FACs). Estas células muestran una morfología alargada, delgada, cruciforme o estrellada; un tamaño mayor que los fibroblastos normales; núcleo dentado; citoplasma basófilo; retículo endoplásmico rugoso abundante; ribosomas libres; un aparato de Golgi desarrollado y un gran número de fibras de tensión (Anderberg & Pietras, 2009; Gascard & Tlsty, 2016; Kalluri, 2016; Liu et al., 2019).

Los FACs promueven el crecimiento tumoral, incrementan la invasividad, fomentan la angiogénesis y reducen la apoptosis de células epiteliales (DeFilippis et al., 2012; Gaggioli et al., 2007; Pietras et al., 2008). Su activación es inducida principalmente por factores paracrinis secretados por células tumorales, como TGF- β , considerado uno de los inductores más importantes de la transformación fibroblasto-miofibroblasto (Kalluri & Zeisberg, 2006; Kuperwasser et al., 2004; Olumi et al., 1999).

Aunque su mecanismo no ha sido descrito por completo, se sabe que los FACs pueden derivarse de diversos tipos celulares como fibroblastos normales, adipocitos, células de músculo liso vascular, células madre mesenquimales, fibrocitos de la médula ósea o pericitos, entre otros (LeBleu & Kalluri, 2018; Y. T. Lee, Tan, Falasca, & Oon, 2020; Sahai et al., 2020) (Figura 5).

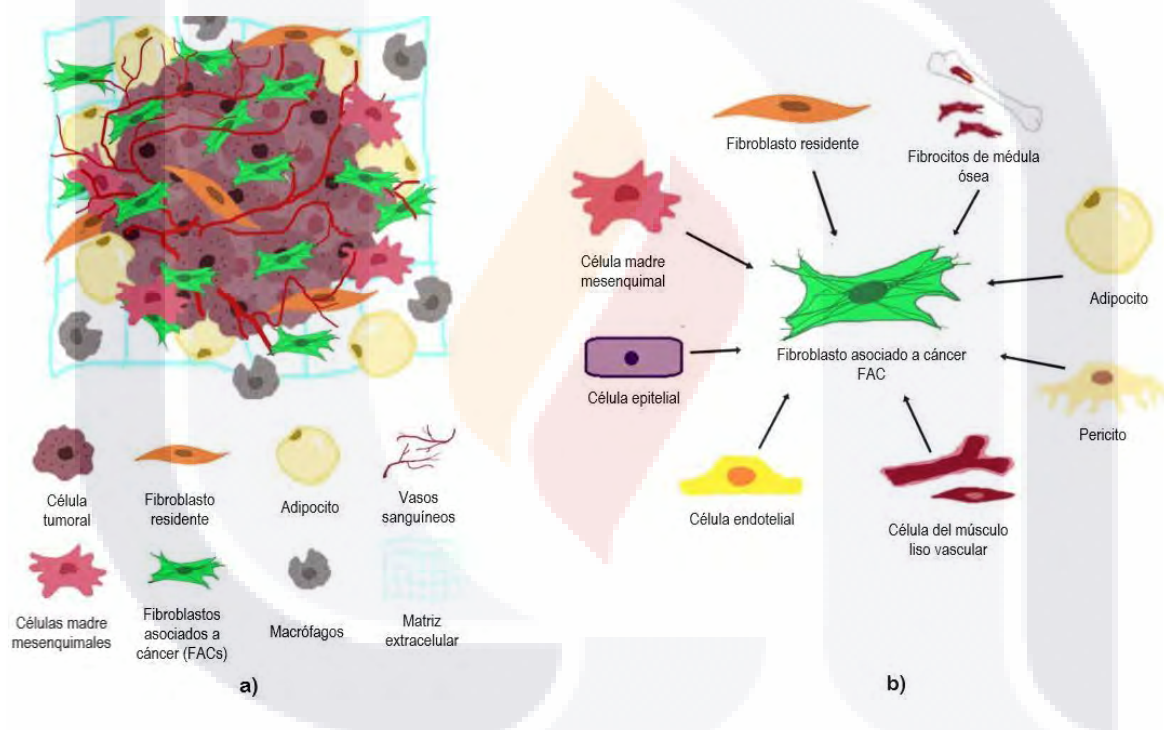


Figura 5. La estructura del microambiente celular y el diverso origen de los FACs. a) El estroma tumoral está compuesto de diversos tipos celulares (macrófagos, adipocitos, fibroblastos), MEC, así como vasos sanguíneos. b) Los FACs puede derivarse de diferentes precursores como son células epiteliales, células de músculo liso vascular, células endoteliales, entre otras. Adaptado de Lee y colaboradores en *Cancers*, 2020.

Esta diversidad impacta en su funcionalidad según el tipo y estadio tumoral (Biffi & Tuveson, 2021; O'Connell et al., 2011).

3.5.2. Fibroblastos asociados a cáncer en cáncer de mama (FACMs)

Aproximadamente el 80% de los fibroblastos normales se transforman en fibroblastos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

asociados a cáncer de mama (FACMs), aunque su origen puede derivarse de otros precursores, como se mencionó antes (Kalluri & Zeisberg, 2006; Y. T. Lee et al., 2020; Qiao, Gu, Guo, Zhang, & Fu, 2016).

La actividad de los FACMs tiene diferentes efectos en la tumorigénesis del cáncer de mama como regular el metabolismo, reprogramación de las células tumorales y remodelación de la MEC. Se sabe que a largo plazo, todos estos eventos tiene un efecto negativo en el pronóstico del paciente, ya que aumentan la proliferación de células malignas, su capacidad invasiva y de metástasis (Buchsbaum & Oh, 2016; Kadel et al., 2019; Qiao et al., 2016; Ruocco et al., 2018). Otra evidencia de que el estroma funciona activamente a favor del desarrollo y progresión tumoral, en este caso los FACMs, es la diferencia en la diversidad de compuestos presentes en co-cultivos de células de cáncer de mama y FACMs, los cuales promueven la proliferación, angiogénesis, metástasis, resistencia farmacológica e invasibilidad celular, por ejemplo hay una regulación a la alta de TGF- β , PDGF- β , interleucinas 6 y 8, metaloproteinasas de matriz (MMP2 y MMP11), inhibidor tisular de MMP1 (TIMP1), factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA), entre otros, los cuales no se encuentran en monocultivos de células cancerosas (Eiro et al., 2018; Ostman, 2014).

El proceso de formación de los FACMs comprende tres pasos: 1) reclutamiento de células distantes por células cancerosas; 2) reprogramación y transformación de células precursoras sanas a FACMs mediante señalización paracrina; y 3) mantenimiento constitutivo del fenotipo pro-tumorigénico en la transición epitelio-mesénquima (TEM) de los fibroblastos activados; y el consecuente mantenimiento de la progresión tumoral (Heneberg, 2016).

Para que un FACM adquiera la capacidad promotora de tumores, requiere realizar cambios en su perfil de expresión génica, estas alteraciones pueden darse por cambios epigenéticos (M. Hu et al., 2005; Peng et al., 2013) o alteraciones genéticas (Kurose et al., 2002; Patocs et al., 2007). Bauer y colaboradores identificaron la modificación de 22 genes relacionados migración y adhesión celular, regulación de la transcripción y vías de señalización paracrina e intercelular (Bauer et al., 2010). Los cambios de expresión no sólo se realizan a la alta, se ha encontrado que los FACMs carecen de expresión de supresores tumorales como p21, p53, y de proteínas como CAV1 y PTEN (Y. T. Lee et al., 2020; Martinez-Outschoorn et al., 2010; Qiao et al., 2016).

Se tiene evidencia de que las diversas respuestas del tumor a la actividad de los FACMs pueden deberse a diferentes subtipos. Como se comentó anteriormente, los FACs son una población celular heterogénea, esta heterogeneidad depende de varios factores como su rol funcional, la

etapa del cáncer y la evolución del linaje celular (Biffi & Tuveson, 2021; O'Connell et al., 2011).

Se han descrito diversas subpoblaciones de FAMCs. Costa y colaboradores (2018), evaluaron muestras de tumor mamario humano, consideraron tanto la expresión de biomarcadores (FAP, α -SMA, FSP1, PDGFR β , IT β 1/CD29, CAV1), así como el subtipo de cáncer de mama en el que son más prevalente. Se clasificaron como FAC-S1 a FAC- S4(Costa et al., 2018).

Bartoschek y colaboradores (2028) lograron caracterizar 4 subpoblaciones más mediante la técnica de scRNA-seq, a partir de 768 transcriptomas de FACs aislados de células mesenquimales aisladas de un modelo tumoral de ratón (MMTV-PyMT). Las subpoblaciones se identificaron con el análisis diferencial de la expresión de genes mediante la base de datos Gene Oncology Knowledgebase Basados en la expresión de biomarcadores, origen y funcionalidad, y fueron nombradas como vFAC, mFAC, cFAC y dFAC (Bartoschek et al., 2018)

Finalmente, un tercer estudio realizado por Friedman en 2020 con tejido tumoral de ratón inducido con la línea celular triple negativo, 4T1 utilizando la técnica de scRNA-seq, caracterizaron dos nuevas subpoblaciones, sFAC y pFAC, evaluando los biomarcadores diferenciales S100A4 y PDPN, encontrando además que, la cantidad y funcionalidad de éstas subpoblaciones varía con el estatus mutacional de BRCA y la etapa en la que se encuentra el tumor (Friedman et al., 2020). Las subpoblaciones descritas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Subpoblaciones de FACs y sus características.

Subpoblación de FACs	Biomarcadores	Características de la subpoblación
FAC-S1	FAP α -SMA CXCL12 IL6	Potencialmente derivados de pericitos, tienen función en inmunosupresión, se han encontrado en ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama metastásico.
FAC-S2	Baja expresión de biomarcadores	Presentes en tejido sano y en cáncer de mama luminal.
FAC-S3	PDGFR β	Presentes en tejido sano y en cáncer de mama luminal
FAC-S4	α -SMA CD29	Presentan un perfil contractil y pro-metastásico, están presentes en ganglios linfáticos, cáncer luminal, enriquecido con HER2 y triple negativo.
FACs vasculares (vFAC)	NID2 CD31 α -SMA PDGFR β	Derivados de pericitos, tienen función en la angiogénesis y desarrollo vascular y se localizan principalmente en el centro tumoral.
FACs de matriz (mFAC)	PDGFR α FBLN1	Se derivan de fibroblastos normales residentes, su función es la síntesis de componentes de la matriz extracelular y transición epitelio-mesénquima. CXCL14 sugiere un papel regulador en la respuesta inmune asociada a tumor. Se localizan principalmente en los límites del tumor.

Facs relacionados con ciclo celular (cFAC)	Ki67 PDGFR β	Participación en el ciclo celular regulando la división celular y angiogénesis. Comparten similitudes en con los vFAC, por lo que se argumenta que pueden derivados de estos.
FACs relacionados al desarrollo (dFAC)	SCRG1 SOX9	Se originan a partir de células endoteliales malignas que inician TEM. Su función se asocia con la diferenciación y desarrollo celular. Se han localizado en epitelio en tumores en etapa temprana y tanto en epitelio como estroma en etapas tardías
pFAC	PDPN	Incluye 6 subgrupos que intervienen en diferentes etapas y funciones en la tumorigénesis: reguladores inmunes tempranos, reguladores inmunes tardíos, cicatrización de heridas, organización de las fibras extracelulares, inflamación.
sFAC	S100a4	Participan en el doblamiento de proteínas y en la regulación metabólica.

α -SMA, alpha actina de músculo liso; CXCL12, Quimiocina 12 con motivo C-X-C; IL6, interleucina-6; PDGFR β , receptor a factor de crecimiento derivado de plaquetas beta; CD29, clúster de diferenciación 29; NID2, nidogen-2; CD31, clúster de diferenciación 31; PDGFR α , receptor a factor de crecimiento derivado de plaquetas alpha; FBLN1, fibulina-1; Ki-67, antígeno Ki-67; SCRG1, gen sensible a scrapie 1, SOX9, factor de transcripción SRY Box 9; NID2, nidogen 2; FAP, proteína de activación de fibroblastos; S100A4, proteína de unión a calcio S100 A4; PDPN, podoplanina.

3.5.3. Papel de los FACs en la resistencia a tratamientos

Anteriormente se relacionaba la resistencia quimioterapéutica a factores genéticos (Majidinia & Yousefi, 2017), sin embargo, nuevos hallazgos indican su relación con los tejidos adyacentes, al TEM y a la relación en la cantidad y activación de células estromales, especialmente los FACs (Dasgupta, Lim, & Ghajar, 2017). Una vasta variedad de mecanismos, directos e indirectos se ven involucrados en la generación de la resistencia farmacológica, desde modificaciones genéticas y epigenéticas, diversidad celular del tumor, metabolismo alterado, inclusive cambios en el estroma tumoral (Das, Mandal, & Kogel, 2018; Jena, Das, Bharadwaj, & Mandal, 2020) (Figura 6).

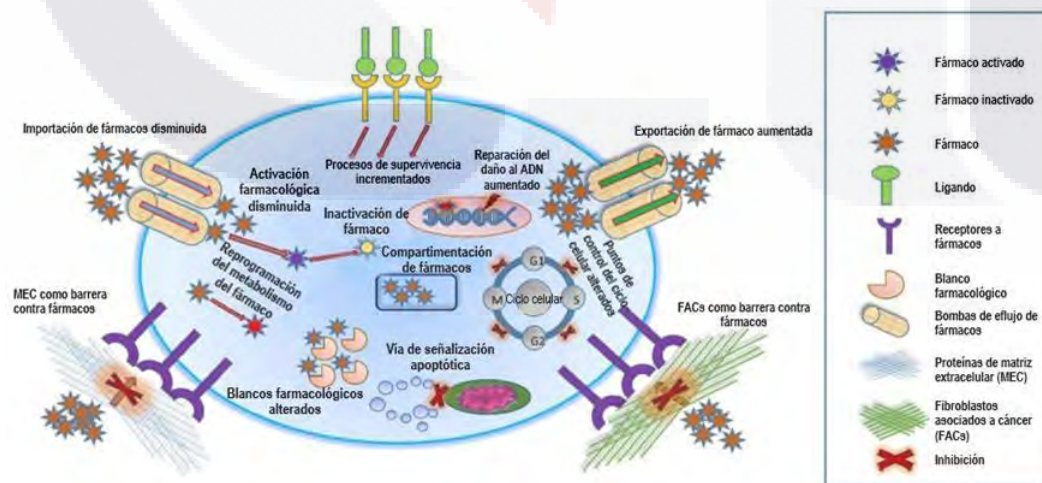


Figura 6. Mecanismos implicados en la resistencia a fármacos. Los FACs y su interacción con el tumor permiten desarrollar algunos mecanismos de resistencia, mediante la creación de una MEC más densa o fungiendo como barrera física. Otros mecanismos son: cambios en la importación y exportación de fármacos, alteraciones en el metabolismo de los fármacos, inhibición de apoptosis, entre otros. Adaptado de Jena y colaboradores, Rev. Cancer, 2020.

La participación de los FACs en la resistencia farmacológica en carcinoma mamario puede darse por diferentes mecanismos. La inducción de la TEM con la expresión de factores de transcripción (como Snail1/2, Twist1, Zeb1/2) y marcadores (N-caderina, vimentina, α SMA, fibronectina, etc) (Baulida, 2017; Noe et al., 2001; Roman-Perez et al., 2012; Yang et al., 2012); el aumento en la densidad y rigidez de la MEC por proteínas derivadas de FACs, formando una barrera física que impide la entrada de quimioterapéuticos, además dificultar la difusión de oxígeno, nutrientes y metabolitos (Henke, Nandigama, & Ergun, 2019; Senthebane et al., 2017); la reprogramación metabólica mediada por FACs (Martinez- Outschoorn et al., 2011; Tavares-Valente, Baltazar, Moreira, & Queiros, 2013; Yu et al., 2017). La resistencia a la quimioterapia puede ser inducida por alteraciones en la respuesta inmune generada por los macrófagos asociados a cáncer y FACs (Ireland et al., 2018). Otro mecanismo inductor de resistencia es el mediado por autofagia de los FACs vía HMGB1 (Zhao et al., 2017) o estimulando glucolisis (Capparelli et al., 2012). El daño al ADN por la generación de especies reactivas de oxígeno induce una inestabilidad genómica que favorece el desarrollo del cáncer, así como la progresión mediante la resistencia (Chen et al., 2018; Jena et al., 2020). El potencial intrínseco de transportar material genético y no genético de los exosomas de los FACs a las células tumorales, le brinda un papel importante en la generación de la resistencia a los tratamientos (Boelens et al., 2014; Jena et al., 2020). Mecanismos resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos de inducción de resistencia a quimioterapéuticos mediada por FACs.

Mecanismo	Factores involucrados	Regulación	Respuesta celular/tisular
Transición epitelio-mesénquima (TEM)	TGF β , Twist 1	Positiva	FACs activados por TGF β disparan la sobreexpresión de factores de transcripción involucrados con TEM.
	SET8		En asociación con Snail1 suprime la expresión de E-caderina y favorece la síntesis de N-caderina
	MMPs		El aumento en la densidad de la matriz induce hipoxia y estrés metabólico conduciendo derivando en un aumento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas y vías de señalización que promueven la quimio-resistencia.
Remodelación de la matriz extracelular (MEC)	HIF-1 α , presión de fluidos intratumorales	Positiva	El aumento en la densidad de la matriz induce hipoxia y estrés metabólico conduciendo derivando en un aumento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas y vías de señalización que promueven la quimiorresistencia.
Metabolismo celular alterado	pH	Negativo	El lactato secretado por FACs disminuye el pH extracelular, y se ha asociado a un aumento en la migración y resistencia a quimioterapéuticos (doxorrubicina y paclitaxel)
	Proteínas inductoras de apoptosis		Aumento del metabolismo mitocondrial inducido por el estroma (FACs) inhibe apoptosis.
	Vía de señalización GPER/cAMP/PKA/CREB	Positiva	Aumento en la actividad glucolítica de los FACs para proveer de piruvato y lactato a las células cancerosas.
Respuesta inmune alterada	MATs / IGF-1/2	Positiva	Regulación al alza de la señalización de IGF, aumentando la infiltración de macrófagos y la progresión tumoral
Autofagia de FACs	HMGB1/TLR4	Positiva	Au tofagia de FACs libera HMGB1 que activa su receptor TLR4 aumentando la tumorigenicidad.
	Glucolisis		Los FACs que entran en autofagia producen 3-hidroxibutirato, estimulando el metabolismo mitocondrial de las células tumorales.

Daño al ADN	ROS	Positiva	Inestabilidad genómica en FACs, secretan factores SASP que conduce a un fenotipo celular más agresivo de las células tumorales.
Formación de exosomas	Exosomas/RIG-1	Positiva	ARN contenido en los exosomas de FACs induce la activación de la vía de señalización antiviral dependiente de STAT1 mediante RIG-1, facilitando las respuestas transcripcionales y expandiendo las células quimioresistentes.

TGFβ, factor de crecimiento transformante beta; Twist1, factor de transcripción de TEM; SET8, histona-metiltransferasa; MMPs, metaloproteinasas de matriz; HIF-1α, factor inducible por hipoxia 1α; GPER, receptor estrogénico acoplado a proteínas G; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; CREB, elemento de unión de respuesta a cAMP; MATs, macrófagos asociados a cáncer; IGF1/2, factor de crecimiento similar a insulina 1/2; HMGB1, High Mobility Group Box 1 (proteína no histona asociada a cromatina); TLR4, receptor tipo Toll 4; ROS, especies reactivas de oxígeno; RIG-1, gen 1 inducido por ácido retinoico antiviral; STAT1, transductor de señales y activado de transcripción.

3.6. Epigenética

La epigenética se define como el estudio de cambios hereditarios en la expresión génica que ocurren sin modificación de la secuencia de ADN (Sharma, Kelly et al. 2010). Estas marcas, esenciales para mantener identidades celulares estables, pueden alterarse y activar o inhibir vías que favorecen enfermedades como el cáncer (Jones and Baylin 2002, Egger, Liang et al. 2004). En tumores, las alteraciones epigenéticas son frecuentes, ocurren tempranamente y pueden superar en número a las mutaciones genéticas, además de ser dinámicas y potencialmente reversibles, lo que las convierte en blancos terapéuticos relevantes (Geutjes, Bajpe et al. 2012; Bjornsson, Sigurdsson et al. 2008). Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, la regulación por microARN y las modificaciones postraduccionales de histonas, las cuales modulan la estructura de la cromatina y, con ello, la accesibilidad al ADN y la activación o represión génica (Dawson, Kouzarides et al. 2012; Yang and Schwartz 2011). Las colas de histonas pueden sufrir acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación o fosforilación, conformando un “código de histona” que regula procesos como transcripción, reparación y replicación (Jenuwein and Allis 2001; Kouzarides 2007). En conjunto, alteraciones genéticas y epigenéticas interactúan para promover la carcinogénesis en todas sus etapas (Jones, Veenstra et al. 1998; Jones and Martienssen 2005).

Las células presentan múltiples modificaciones de histonas con funciones activadoras o represivas que conforman una red esencial para la regulación génica (Bernstein, Meissner et al. 2007; Kouzarides 2007). El análisis genómico ha permitido identificar patrones definidos de estas marcas y entender cómo actúan de manera combinatoria para establecer perfiles globales de expresión y determinación de identidad celular (Barski, Cuddapah et al. 2007; Wang, Zang et al. 2008; Sharma, Kelly et al. 2010).

En cáncer, la secuenciación de alto rendimiento ha mostrado alteraciones epigenéticas tempranas, destacando la pérdida global de H4K16ac y H4K20me3 (Weisenberger, D Siegmund et al. 2006). La disminución de acetilación, mediada por histona desacetilasas (HDACs), favorece la represión génica. Estas enzimas suelen estar sobreexpresadas en tumores y constituyen blancos relevantes para terapia epigenética (Fraga, Ballestar et al. 2005; Zhao, Rank et al. 2009). En contraste, las HATs también pueden modular genes asociados a la progresión tumoral (Baylin and Ohm 2006; De Souza and Chatterji 2015).

3.6.1. Histona desacetilasas (HDACs)

Las HDACs clásicas se agrupan en dos clases principales: clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), homólogas a RPD3 de *Saccharomyces cerevisiae*, y clase II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10), estructuralmente relacionadas con HDAC11 (Bjerling, Silverstein et al. 2002; Fischle, Dequiedt et al. 2002). Mientras las enzimas de clase I presentan expresión amplia en la mayoría de los tejidos, las de clase II muestran un patrón más restringido, lo que sugiere funciones específicas en diferenciación y desarrollo (Buggy, Sideris et al. 2000; Galasinski, Resing et al. 2002; de Ruijter, van Gennip et al. 2003).

La actividad de las HDACs depende de su localización nuclear, facilitada por señales NLS o por interacción con otras proteínas. Las HDACs de clase I residen casi exclusivamente en el núcleo, como se demostró para HDAC8 mediante su sobreexpresión (Van den Wyngaert, de Vries et al. 2000). Su función catalítica consiste en remover grupos acetilo de lisinas en histonas, promoviendo la compactación de la cromatina y la represión transcripcional (Strahl and Allis 2000; Wade 2001). El sitio activo posee un bolsillo catalítico tubular, dependiente de un ion Zn^{+} esencial para un sistema de relevo de carga; los inhibidores de HDAC actúan desplazando dicho ion (Finnin, Donigian et al. 1999; Buggy, Sideris et al. 2000).

Alteraciones en el equilibrio entre la actividad de HATs y HDACs se han asociado con tumorigénesis. En tumores sólidos se han identificado mutaciones e inactivaciones de HATs (Minucci, Nervi et al. 2001) y pérdidas globales de H4K16ac y H4K20me3 en regiones repetitivas, paralelas a la hipometilación del ADN, un sello epigenético del cáncer (Fraga, Ballestar et al. 2005). Aunque la acetilación reducida no permite predicciones clínicas por sí sola, suele correlacionarse con peor pronóstico.

La expresión de HDACs es variable entre tumores de la misma entidad; en general, las HDACs de clase I están aumentadas en tejido tumoral, mientras que las de clase II suelen estar disminuidas y asociadas a mejor supervivencia (Weichert 2009). La evidencia funcional más sólida sobre su relevancia en cáncer proviene del uso de inhibidores de HDAC, que revelan diferencias sustanciales entre células normales y malignas (Minucci and Pelicci 2006).

3.6.2. Histona desacetilasa 1 (HDAC1)

La HDAC1, es una proteína HDAC clase I dependiente de zinc que contiene 482 aminoácidos con un peso molecular teórico de 55.18 kDa, se expresa de forma ubicua y se localiza en el núcleo celular principalmente. Es responsable de alteraciones genéticas que conducen a la modulación de la estructura de la cromatina y a la regulación transcripcional mediante la desacetilación de los residuos de lisina del extremo N-terminal de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Ha mostrado un papel importante en la regulación del ciclo celular y en la hematopoyesis (Dovey, Foster et al. 2010).

Dentro de las 18 isoformas de HDACs identificadas en el humano, las de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8) han mostrado ser las más importantes, a pesar de que todas se expresan en el núcleo, sus funciones y valor pronóstico varían en diferentes tipos de cáncer (Weichert 2009). Varios estudios correlacionan la expresión de la HDAC1 con la progresión y mal pronóstico en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Zhang, Yamashita et al. 2005). Senese y colaboradores (2007), reportaron que una sobreexpresión de HDAC1 puede conducir a la proliferación de células tumorales (MCF7, MCF-10A), mientras que un silenciamiento de la enzima (mediante siRNA HDAC1) puede inhibir el crecimiento de las mismas, al debilitar la transición de G2/M, induciendo un aumento en el porcentaje de células en apoptosis y una disminución en las células en mitosis (Senese, Zaragoza et al. 2007). También se ha demostrado el importante rol de HDAC1 en la diferenciación, invasión y apoptosis de células tumorales, mediante la inhibición transcripcional de genes supresores de tumores, y, de esta manera, influenciando en el ciclo celular (Glozak and Seto 2007, Tang, Yan et al. 2013). Tang y colaboradores han reportado que la HDAC1 induce proliferación y migración de células cáncer de mama mediante la activación de la señalización de Snail/IL-8 (Tang, Ding et al. 2017).

Si bien, todos los miembros de las HDACs son importantes en la regulación transcripcional, la HDAC1 ha sido descrita su papel como factor epigenético crucial. Se ha sugerido la importancia de muchos inhibidores de HDAC (HDACi) como posibles tratamientos no sólo en cáncer, si no

en diferentes patologías (Qiu, Xiao et al. 2017, Zhang, Shang et al. 2017). Además, se ha descrito a HDAC1 como un regulador clave de p21 y p27, inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CDK) (Lagger, Meunier et al. 2010). Una inhibición específica de esta enzima puede suprimir la capacidad invasiva de las células de cáncer de mama al regular a la baja la metaloproteasa de la matriz extracelular 9 (MMP-9)(Park, Jun et al. 2011). Se ha encontrado además que, la HDAC1 forma complejos con la proteína adaptadora RbAp48 y el co-represor transcripcional mSi3A para mediar la expresión génica de manera desacetilación-dependiente (Hassig, Tong et al. 1998).

La reparación del material genético se realiza mediante diversos mecanismos, en los que las HDACs juegan un papel primordial, al participar como reguladores centrales en la remodelación de la cromatina y en el nivel de acetilación de proteínas relacionadas a daño al ADN (Li and Zhu 2014). Por ejemplo, la HDAC1 interactúa con la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM), la cual es una serin-treonina cinasa, que se activa en respuesta al daño al ADN, dicha interacción es aumentada con la radiación ionizante (Kim, Choi et al. 1999). Demás evidencia demuestra que HDAC1 y 2 son rápidamente reclutadas hasta los sitios de daño al ADN para promover la hipoacetilación de H3K56. La depleción de estas enzimas induce una mayor sensibilidad de las células tumorales a agentes que dañan el ADN y disminuye la habilidad de reparación de la doble cadena (Miller, Tjeertes et al. 2010) (Figura 7).

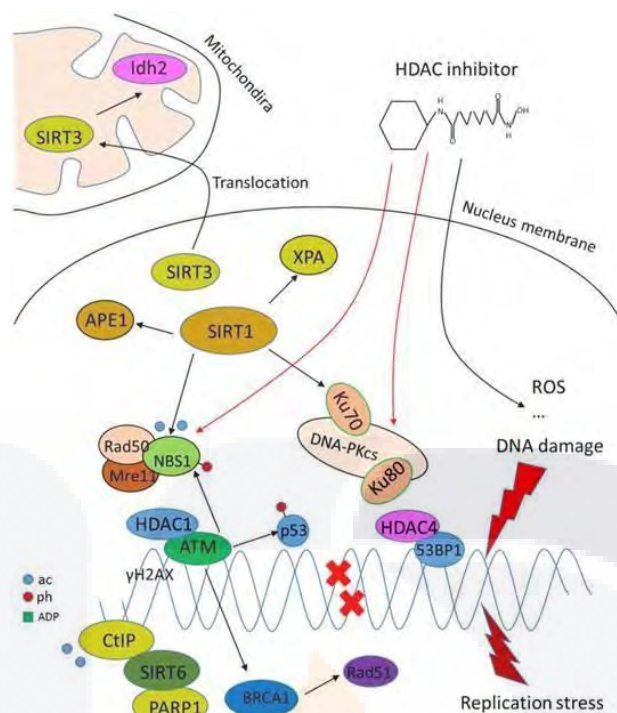


Figura 7. Papel de las HDAC en la regulación de la reparación del ADN. Las HDACs interactúan con factores de respuesta de daño al ADN y promueven la reparación del mismo. Los HDACi inducen daño al ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la supresión de las proteínas que reparan el ADN. Obtenido de Li y Zhu, *Int J Biol Sci*, 2014.

3.6.3. Blancos terapéuticos dirigidos a la epigenética de FACMs

El cambio fenotípico de fibroblastos normales a FACs son procesos coordinados y dirigidos por activadores y represores transcripcionales, microARNs y enzimas que participan en las modificaciones postranscripcionales que reprograman la epigenética del genoma, especialmente las histonas-desacetilasas (HDACs) (Massague, 2012).

Es bien sabido que las HDACs se sobreexpresan en diversos tipos de cáncer, ya sean sanguíneos o tumores sólidos (Bolden, Peart, & Johnstone, 2006) y que los inhibidores de algunas isoformas de estas enzimas (iHDACs) y otras drogas que modifican la epigenética prometen convertirse en nuevas terapias para evitar la progresión con menos efectos adversos en pacientes. La mayoría de los nuevos tratamientos están diseñados para atacar blancos epigenéticos que contribuyan a la proliferación y supervivencia de las células cancerosas, sin embargo, pocos estudios se han enfocado en los subtipos celulares presentes en la MEC y que son de importancia farmacológica debido a sus múltiples efectos, como son los FACs (Barbarotta & Hurley, 2015; Damaskos et al., 2016; Kim et al., 2018; J. H. Lee, Choy, Ngo, Foster, & Marks, 2010; Libby et al., 2015; Mann et al., 2007; Woo, 2016).

Un estudio realizado por Kim y colaboradores (2018), muestra que la actividad *in vitro* del Scriptaid (iHDAC) antagoniza la expresión genética mediada por TGF β en FACs, reduciendo el depósito de proteínas de matriz extracelular, así como su contractilidad y rigidez, además de retrasar el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo*. Potencialmente, Scriptaid puede revertir el microambiente tumoral que favorece la progresión de la enfermedad al prevenir los procesos mecanosensoriales intrínsecos en los FACs y células tumorales (Kim et al., 2018). Aunque estos nuevos blancos terapéuticos resultan promisorios, se requiere conocer más el papel que desempeñan los diferentes isotipos de estas enzimas en la progresión tumoral, ya que se ha sugerido que algunos iHDAC, especialmente de la isoforma HDAC2 pueden incrementar la expresión de factores que pueden fomentar la progresión del tumor (Nguyen et al., 2017; Pazolli et al., 2012).

El Vorinostat (pan-iHDAC) en células 4T1, inhibe la actividad de la MMP-9 y reprime la migración e invasibilidad celular. MMP-9 participa en la degradación de colágeno IV y su sobreexpresión se ha asociado con la capacidad invasiva, metastásica y diversos tipos de carcinoma (Cupić, Tesar, Ilijas, Nemrava, & Kovacević, 2011; X. Hu et al., 2012; Y. Li, Wu, Zhang, Yao, & Yin, 2012; Tang, Chiang, & Sun, 2008; Wang et al., 2015). El uso de Vorinostat en combinación con radiación ionizante muestra una inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma mamario ortotópico en ratón indicando una posible sensibilización tumoral a la radioterapia, además de una disminución significativa de la metástasis pulmonar, probablemente por la inhibición de la actividad de MMP-9 (Chiu et al., 2013).

3.6.4. Inhibidores de HDACs

Los inhibidores de histona desacetilasas (HDACi) ejercen actividad anticancerígena al modular procesos alterados en células neoplásicas, principalmente mediante la inducción de diferenciación, la detención del ciclo celular y la activación de apoptosis. Adicionalmente, pueden contribuir a la regresión tumoral *in vivo* mediante la activación de la respuesta inmunitaria y la inhibición de la angiogénesis (Johnstone, 2002).

Estructuralmente, los HDACi se agrupan en cuatro clases principales: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas. El Tricostatin A (TSA) fue el primer hidroxamato natural identificado como inhibidor de HDAC. Vorinostat (SAHA), análogo estructural del TSA, fue el primer HDACi aprobado por la FDA para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Los HDACi alifáticos, como butirato, fenilbutirato y ácido valproico, muestran una potencia inhibitoria menor, requiriendo concentraciones milimolares para su actividad (Hyun-Jung & Suk-Chul,

2011) (Figura 8).

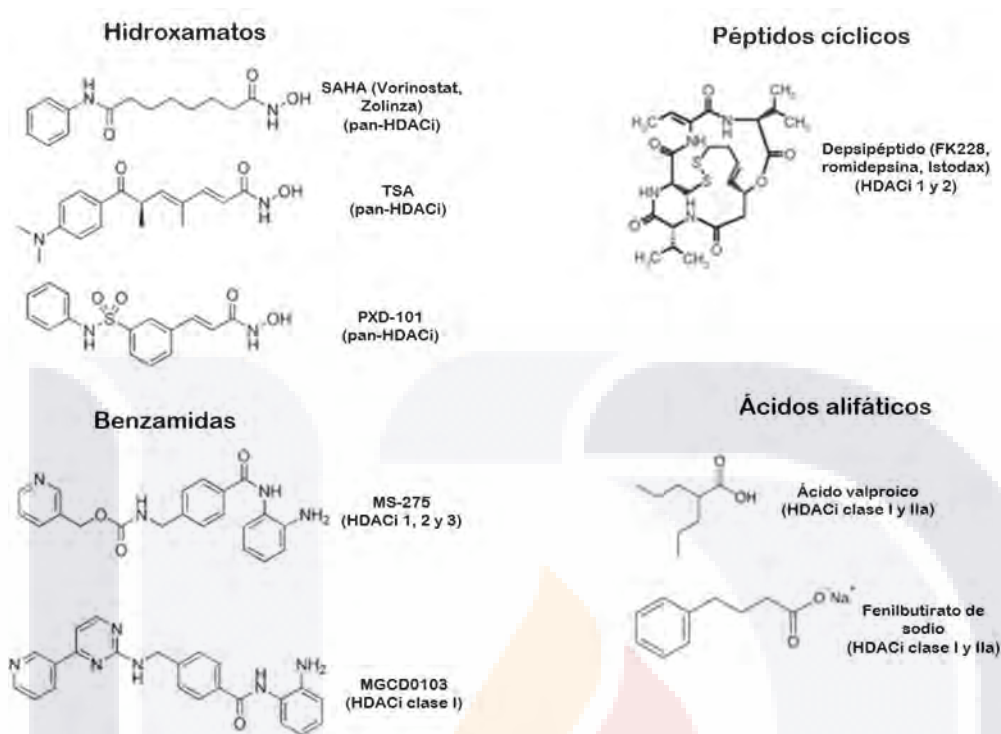


Figura 8. Clasificación general de inhibidores de la HDAC. El ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA) muestra actividad a concentraciones μM . El ácido valproico presenta especificidad por HDAC clase I y clase IIa. Adaptado de Hyun- Jung & Suk-Chul, American Journal of Translational Research, 2011.

Los inhibidores de histona desacetilasas (HDACi) ejercen efectos anticancerígenos al modificar la acetilación de histonas y proteínas no histonas, regulando la expresión génica, promoviendo apoptosis, deteniendo el ciclo celular, induciendo diferenciación e inhibiendo la angiogénesis. También poseen actividad inmunomoduladora y pueden inducir muerte celular tanto en células proliferativas como no proliferativas (West & Johnstone, 2014).

Los HDACi incrementan la expresión de múltiples genes reprimidos en cáncer, efecto que varía según el tipo de inhibidor, el tiempo de exposición y el linaje celular estudiado. Algunos cambios transcripcionales son directos, mientras que otros corresponden a respuestas posteriores (Ungerstedt et al., 2005; Peart et al., 2005).

En modelos celulares, los HDACi inducen apoptosis, disminuyen la proliferación y promueven el arresto del ciclo, en parte mediante la reducción de proteínas como FLIP y factores antiapoptóticos, así como la disminución de VEGF, clave en la angiogénesis tumoral (Stearns et al., 2007) (Tabla 4).

Tabla 4. Efectos biológicos múltiples de los inhibidores de las histona-desacetilasas.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN	EFEECTO
Inducción de apoptosis	↑p53
	↑DR4
	↑Bax, Bak
	↓FLIP
	↓IAPs
Inducción de arresto celular	↓Bcl-2, Bcl-xl
	↑p21
	↑p27
	↓Ciclina D
	↓CDk4
Desestabilización de oncogenes	↓Timidilato sintasa
	↓BCR/abl
	↓HER2/neu
	↓EGFR
	↓FLT-3
Antiangiogénesis	↓pAKT
	↓ER α
	↓VEGF
	↓Ang2
	↓Tie2
	↓HIF-1

3.6.4.1. Ácido valproico

El ácido valproico (VPA) es un ácido graso ramificado de ocho carbonos, sintetizado por primera vez en 1882. Farmacológicamente, es un anticonvulsivante de amplio espectro y constituye uno de los fármacos de primera elección para epilepsias generalizadas y parciales. Además, se emplea en el manejo de trastornos bipolares, migraña y dolor neuropático. A pesar de su eficacia clínica, el VPA presenta un riesgo teratogénico significativo, asociado principalmente a defectos del tubo neural en exposición temprana. Durante la última década, se ha demostrado que varios de los mecanismos implicados en su teratogenicidad incluyendo la inhibición de histona desacetilasas también contribuyen a sus propiedades antitumorales, lo que ha impulsado su estudio como agente con potencial terapéutico en oncología (Blaheta et al., 2002).

El ácido valproico (VPA) regula vías clave de control celular mediante la inducción de p21WAF1/CDKN1A (Cheng, Lin et al. 2007), favoreciendo el arresto del ciclo en G1/S. A nivel apoptótico, sensibiliza a las células a la apoptosis mediada por TRAIL/Apo2L al incrementar la expresión de los receptores DR4 y DR5, y al reducir proteínas antiapoptóticas como c-FLIP, componentes del DISC y Bcl-2/Bcl-xL. Esta modulación se traduce en una mayor activación de caspasa-3 y ha sido confirmada en diversos tipos de cáncer, incluyendo leucemias y tumores

sólidos (Schuchmann, Schulze- Bergkamen et al. 2006, Ziauddin, Yeow et al. 2006, Lagneaux, Gillet et al. 2007, Iacomino, Medici et al. 2008, Chateauvieux, Morceau et al. 2010).

El VPA también induce la expresión de caspasa-11, Fas y Fas-L, potenciando la apoptosis dependiente de la vía Fas y reduciendo la expresión de Bcl-2. En cáncer de mama, inhibe el crecimiento de líneas celulares independientes de receptores hormonales y potencia la eficacia de agentes endocrinos como tamoxifeno, raloxifeno, fulvestrant y letrozol, favoreciendo la regresión tumoral incluso en modelos resistentes (Phillips, Bullock et al. 2003; Angelucci, Valentini et al. 2006; Olsen, Meussen-Elholm et al. 2004, Mongan and Gudas 2005; Hodges-Gallagher, Valentine et al. 2007).

El ácido valproico (VPA) ejerce parte de sus efectos antitumorales y teratogénicos mediante la activación de PPAR δ y la modulación de la vía Wnt, además de su actividad como inhibidor de HDACs de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8) en concentraciones milimolares, sin efecto relevante sobre las HDACs de clase II (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001). Aunque ha sido evaluado en diversos tipos de cáncer, su uso se ha limitado por hepatotoxicidad y baja potencia antiproliferativa (Miller et al., 2003; Khan et al., 2008). En células MCF-7, VPA disminuye el crecimiento celular e induce apoptosis (activación de caspasas-3 y -9) y arresto en G1, probablemente mediante el aumento de p21 y la reducción de ciclina D1, efectos dependientes de la dosis y el tiempo de exposición (Ma et al., 2017).

3.6.4.2. Ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA)

El ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) fue el primer inhibidor de HDAC aprobado por la FDA para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T avanzado. Forma parte de los compuestos híbridos polares (CHP), caracterizados por dos grupos polares separados por una cadena apolar de 5–6 carbonos, derivados del prototipo HMBA. SAHA fue diseñado para mejorar la potencia y reducir la toxicidad mediante la incorporación de un grupo fenilo terminal, y su estructura se relaciona con la de tricostatin A (Richon et al., 1998) (Figura 9).

SAHA induce diferenciación y apoptosis en células transformadas *in vitro* e *in vivo* (De Souza & Chatterji, 2015). Su actividad se atribuye a la inhibición de HDACs (Figura 15), provocando la acumulación de proteínas acetiladas y la alteración de la expresión génica, así como efectos no transcripcionales como el arresto del ciclo celular (Marks, 2007). SAHA regula múltiples genes, induciendo p21, TBP-2, metalotioneína II y H2B, y reprimiendo ciclina D, ErbB2, timidilato sintasa e importina β (Richon, 2006).

Dado el efecto antitumoral de los HDACi y la hepatotoxicidad del ácido valproico (VPA), Prestegui-Martel et al. (2016) diseñaron *in silico* el derivado arilado HO-AAVPA, combinando el núcleo arilamida de SAHA con sustituyentes en el carboxilo para incrementar la inhibición y reducir la toxicidad. El diseño mantuvo la capacidad de interacción del VPA con el “acetyl-shuttle site” (ASL) de HDAC8 descrito por Vannini et al. (2007), cercano al sitio estérico. La afinidad mejorada dependió de interacciones débiles generadas por los nuevos sustituyentes, que modulaban la interacción con el Zn^{2+} catalítico. Los derivados arilados mostraron un modo de unión distinto al del VPA original, semejante al reconocimiento observado para SAHA, lo que explica sus mayores afinidades (Bermúdez-Lugo et al., 2012; Prestegui-Martel et al., 2016) (Fig. 11).

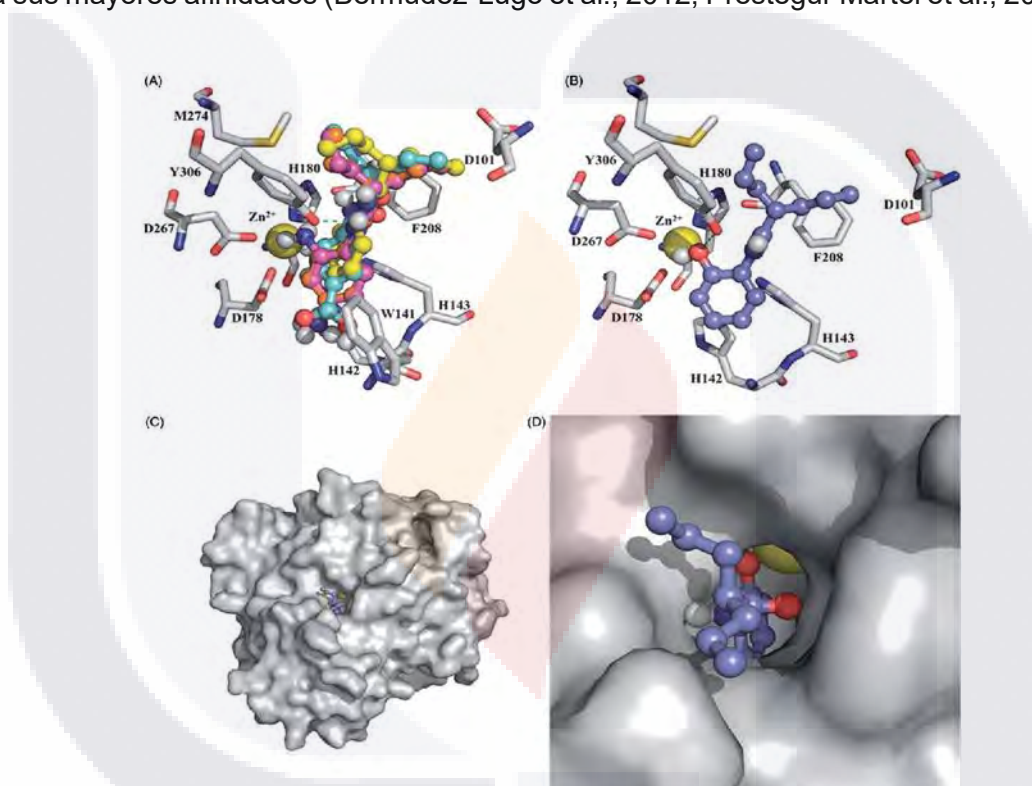


Figura 9. Interacciones de diversos compuestos aril derivados de VPA, incluido el N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida. (A) Los ligandos son capaces de adoptar la misma posición de unión. (B) N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida se coordina con el átomo de Zn^{+3} . (C) y (D) se muestra la cavidad en la HDAC8 alcanzado por los ligandos. Prestegui-Martel et al., Journal of enzyme inhibition and medical chemistry, 2016.

De los estudios *in silico* se obtuvo el compuesto más prometedor, llamado N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA), cuyo efecto inhibitorio fue probado *in vitro* en diversas líneas celulares de cáncer de mama, mostrando que el compuesto HO-AAVPA es capaz de inhibir el crecimiento celular de células sensibles a estrógeno, actuando de forma dependiente de la concentración (Prestegui-Martel, Bermudez-Lugo et al. 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad de gran prevalencia en mujeres mayores de 20 años y graves repercusiones médicas y económicas y abarca todos los niveles sociales. A nivel latinoamericano, se estima que el 29% de casos de cáncer corresponden a cáncer de mama. Existen tratamientos como la quimioterapia y radioterapia con resultados muy variables y en las últimas dos décadas, el tamoxifeno ha sido el tratamiento predilecto para para pacientes que padecen cáncer de mama. El uso de este y otros compuestos, entre ellos los inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACi), como el ácido valproico como adyuvante en el tratamiento temprano del cáncer mamario mejora la supervivencia y se piensa que su uso ha contribuido de manera significativa a la reducción de la mortalidad, sin embargo, a pesar de los beneficios evidentes de estos tratamientos, es muy común la resistencia al tratamiento, desarrollo de metástasis en el 40% de los pacientes, en el caso del tamoxifeno debido a la baja sensibilidad de las células tumorales por el aumento de matriz extracelular (MEC) en el tumor y de hepatotoxicidad para el ácido valproico.

La evidencia de que las modificaciones epigenéticas, hablando específicamente de la sobre expresión de la enzima HDAC1, y su función en la conversión de fibroblastos normales a CAFs ocurre mediante la acción coordinada de represores/activadores transcripcionales, además de la reprogramación genómica mediada por miRNAs.

La generación de compuestos dirigidos específicamente a las enzimas, como el HO- AAVPA, abre un panorama alentador, ya que se piensa, pueden ser utilizados cuando los tumores presentan una resistencia a la terapia, ya sea como monoterapias o como adyuvante con una mayor potencia y menor toxicidad. Sin embargo, el efecto anticanceroso del HO-AAVPA, ha sido estudiado *in vitro*, posee efectos antitumorales en líneas celulares de cáncer de mama como de cérvix, sin embargo, pero su efecto antifibrótico no ha sido probado.

5. HIPOTESIS

El compuesto HO-AAVPA, un inhibidor de la HDAC1, disminuye la deposición de la matriz extracelular de un tumor mamario triple negativo inducido en ratones hembra.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar histopatológica y molecularmente el efecto antifibrótico del compuesto HO-AAVPA en un modelo de cáncer murino.

7. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Inducción de tumor mamario triple negativo en ratones hembra, cepa Balb-C.
- 2) Evaluar la evolución del desarrollo tumoral en base a su tamaño.
- 3) Estudiar el efecto antifibrótico del compuesto HO-AAVPA a diferentes dosis en grupos de ratones inoculados con la línea celular 4T1.
- 4) Analizar la modificación en la expresión proteínas relacionadas a fibrosis como respuesta al tratamiento con OH-AAVPA.

8. METODOLOGÍA

8.1. Síntesis del N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)

Por goteo, en atmosfera de nitrógeno, se añadió cloruro de oxalilo (6 mL, 70.91 mmol) al ácido valproico (5 g, 34.67 mmol) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 4h. Se adicionó 8.33 mL de una solución de trietilamina al 20% en tetrahidrofurano (THF) a 0°C y se dejó agitar por 15 min, posteriormente, se adicionó por goteo el 2-aminofenol (3.67 g, 33.63 mmol) en 5 mL de THF a 0°C, una vez disuelto, se dejó en agitación a temperatura ambiente por 8 h. La reacción se neutralizó con 25 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se realizó la extracción del crudo de reacción con 33.3 mL de diclorometano y se realizaron 3 lavados con 42 mL de diclorometano (Figura 10).

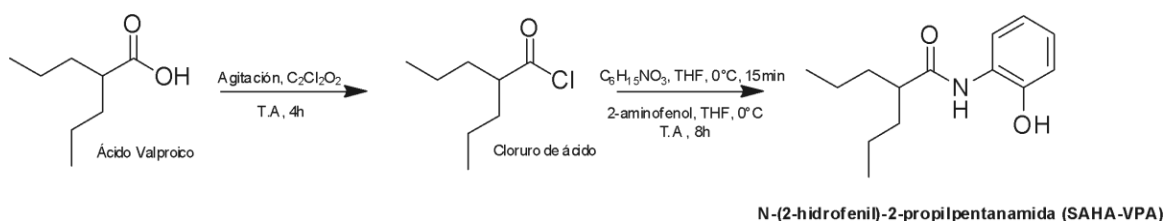


Figura 10. Ruta sintética de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA).

8.2. Purificación de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)

La purificación del producto se realizó por cromatografía en columna utilizando silica gel como soporte y una mezcla de hexano/acetato de etilo 95:5 como fase móvil. El monitoreo de la purificación y reacción se realizó por cromatografía en capa fina. Finalmente se realizó una recrystalización con una mezcla de hexano/diclorometano 2:1, buscando obtener el producto deseado en forma de cristales hexagonales blancos con un rendimiento $\geq 60\%$.

8.3. Caracterización química de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México) y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se controlaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre láminas de aluminio con gel de sílice 60 GF254 y un indicador fluorescente (visualizado con luz UV de 254 nm). La cromatografía Flash se realizó usando gel de sílice 60 (malla 230- 400). Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos con el fusiometro análogo Stuart SMP11. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se registraron en un espectrómetro Bruker Ascend 750 usando dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) como disolvente y TMS como patrón interno. Para asignaciones completas de datos, se usaron espectros 2D HSQC y HMBC. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm campo abajo del estándar interno (CH_3) 4Si y las constantes de acoplamiento en hercios (Hz). Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro FT IR Perkin-Elmer (Spectrum GX). Solo se muestran bandas de absorción significativas, con valores de absorción expresados como números de onda (cm^{-1}). La espectrometría de masas de alta resolución de ionización por electrospray se realizó con un instrumento Bruker micrOTOF-Q II y Agilent 6545 Q-TOF LC / MS.

8.4. Inducción de cáncer mamario triple negativo

Se realizó el subcultivo de la línea celular 4T1, de acuerdo con las especificaciones del American Type Cell Culture (ATCC®), en medio RPMI 1640 enriquecido al 10% con suero fetal

bovino (GIBCO®), una vez alcanzada la confluencia del 70-80%, se cosecharon las células con EDTA (Sigma-Aldrich ®) en PBS 1x, se realizó el conteo de las células viables y se re-suspendió el pellet en 1 mL de medio RPMI. Previa anestesia con vapores de Sevoflurane, con una jeringa de insulina se inocularon, subcutáneamente en el dorso en el dorso, a la altura de la escápula, 750 mil células/50µL de medio RPMI de ratones Balb-C hembras de 8-9 semanas de edad.

8.5. Tratamientos

Se prepararon diferentes soluciones: valproato de sodio en PBS 1x (600mg/kg de peso en 20µL), vehículo mezcla 1:1 de etanol y aceite de ricino (20µL) y el compuesto HO-AAVPA a dosis de 20, 40, 80 mg/kg de peso. Cada dosis de HO-AAVPA se disolvió en el vehículo (solución alcohol etílico:aceite de ricino, 1:1) y se inyectaron vía subcutánea por 21 días. Al día 22 los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg), se colocaron en decúbito ventral sobre la mesa de operaciones, se fijaron por las patas. Se disecó el tejido tumoral del torso del animal, retirando del tejido muscular y piel. Los animales fueron pesados semanalmente: Antes de la inoculación y cada 8 días hasta la terminación del experimento. El número final de animales incluidos en los estudios histológicos, inmunohistoquímicos y bioquímicos fueron los siguientes: tumor inoculado (n=8), vehículo (n=9), VPA 600mg/kg (n=5), HO-AAVPA 20mg/kg (n=7), HO-AAVPA 40mg/kg (n=7) y HO-AAVPA 80mg/kg (n=7),

8.6. Histología

Una vez fijadas las muestras tisulares de hígado y tumor, los tejidos fueron incluidos en parafina, se cortaron, se montaron en lamillas histológicas, se tiñeron con las técnicas de hematoxilina y eosina (H-E) para el tejido hepático y por las técnicas de H y E, ácido periódico de Schiff (PAS), tricrómica de Masson y rojo Sirio, y se procedió a estudiar la histopatología utilizando el microscopio de luz (modelo Optiphot-2 de la marca Nikon), tomándose fotografías representativas de cada condición experimental. Además, las laminillas teñidas con rojo Sirio fueron estudiadas bajo luz polarizada para cuantificar la cantidad de colágena de los tumores por unidad de área. Para esto, se fotografiaron 7 campos por laminilla excluyendo las zonas con tejido muscular remanente. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji versión 1.0.

8.7. Inmunofluorescencia

Los cortes tisulares adheridos a laminillas silanizadas se desparafinizaron 1 H a 56°C. Posteriormente se rehidrataron en xilol (2x25 min) y en etanol a varias concentraciones: 100% (2x3 min), 96% (2x3 min), 70% (1x3 min), 50% (1x3 min), agua destilada (1x3 min) y finalmente PBS (1x3 min). Para el desenmascaramiento de antígenos, en olla convencional BIOCARE® con buffer de citratos a pH6, se colocaron en la olla 400-450mL de agua destilada y se calentó tapada por 6 min, colocar la Coplin con la solución de citratos y laminillas rehidratadas en el centro de la olla. Se colocaron por 5 min en el microondas y se dejó “campanear” por 1 min. Se colocó la coplin en hielo para enfriarlo. Una vez fría la coplin, se lavó con PBS (1X) 5 min/3 veces. El siguiente paso consistió en permeabilizar membrana incubando con solución PBS-TRITÓN al 1% o PBS-TWEEN al 2% durante 25 min. Para bloquear uniones inespecíficas, se incubó con solución de suero de caballo al 5% o albúmina 1% en PBS 1X durante 1 H en cámara húmeda a temperatura ambiente (TA). Se realizaron lavados con PBS (1X) 5 min/3 veces. Se incubó con anticuerpo primario toda la noche a TA o durante 1 H a 37°C (HDAC1 1:500 y α -SMA 1:700) y se lavó con PBS (1X) 3veces/5 min. Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario conjugado fluorocromo (Alexa 488 1:500 o rodamina 1:500) por 1 h a 37°C en cámara húmeda y oscura, se lavó con PBS 3veces/5 min. Se realizó la tinción nuclear con Hoescht por 10 min (1:1000), se lavó con PBS 3veces/5 min y finalmente se montó con glicergel y se observó al microscopio de epifluorescencia.

Para marcaje de dos proteínas de interés, se realizó una fijación con PFA (paraformaldehído) 2% por 15 min, se lavó PBS 3x5 min para posteriormente incubar con anticuerpo primario durante toda la noche a TA o durante 1h a TA y 30 min a 37°C. Se lavó con PBS 3x5 min, se incubó con el anticuerpo secundario (diferente fluorocromo) 1 H a 37°C, se lavó con PBS (1X) 3x5 min y se procedió con la tinción nuclear y el montaje como se mencionó antes.

8.8. Western Blot

8.8.1. Extracción de proteínas.

A partir de tejido tumoral congelado en nitrógeno líquido y conservado en congelación a - 80°C, se pesó el tejido y colocó en un tubo eppendorf de 2mL, adicionando enseguida el volumen en una relación 1:12 m/v de buffer RIPA conteniendo 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio y 0.1% SDS, suplementado con un Mini cOmplete®. El tejido con el buffer se homogenizó con ayuda del sonicador hasta la disgregación del tejido en baño de

hielo para mantener la temperatura. Una vez disgregado el tejido, se colocó en agitación a 4°C por 45 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf de 2mL limpios y almacenó a -20°C hasta su cuantificación.

8.8.2. Cuantificación de proteínas.

Se realizó la cuantificación de proteínas con el kit comercial Pierce® BCA (Thermo- Scientific, cat. 23225) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Una vez obtenida la cantidad de proteína extraída ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se preparó la muestra con buffer de carga, evitando hervirla para no degradar la muestra.

8.8.3. Immunoblotting

Las muestras para GPER fueron desnaturalizadas a temperatura ambiente para prevenir la agregación, mientras que las muestras para GAPDH y COL1 fueron hervidas a 95°C por 5 min. Se cargaron 40 μg de proteína en un gel de poliacrilamida-SDS al 7% utilizando el estándar de proteína preteñido PageRuler® Plus de 10-250 kDa (Thermo-Fisher, cat. 26219), realizando la electroforesis a 80V por 2.5h. Una vez alcanzado la separación de las bandas deseada, se realizó la inmunotransferencia de las proteínas a una membrana de Immun-Blot® PVDF activada con metanol, transfiriendo toda la noche en baño de hielo a 12A. Una vez transferida, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca, se cortaron las bandas de interés de acuerdo al peso molecular, se reactivó la membrana con metanol absoluto y se colocaron en leche descremada al 5% en TTBS 0.1% por 1h en agitación constante a temperatura ambiente. Al finalizar el bloqueo, se coloca la membrana en el anticuerpo primario específicos COL1A1 (cat. GTX112731, dilución 1:1500, GeneTex, GeneTex Inc., Irvine, CA, USA), GPR30 (cat. GTX107748, dilución 1:500 dilución, GeneTex, GeneTex Inc., Irvine, CA, USA) y GAPDH (cat. G9545, dilución 1:10000, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) diluidos en leche descremada 5% en TTBS 1% toda la noche a 4°C en agitación constante. Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con agua destilada (1x5 minutos), posteriormente con TTBS 0.01% (2x10 minutos) y finalmente con TBS (1x5 minutos). Las membranas lavadas se colocaron en los anticuerpos secundarios anti-conejo (Sigma Aldrich, A0545, dilución 1:2000) y anti-ratón (Zymed, 62-6520, dilución 1:15000) en leche descremada 5% en TTBS 0.1% por 2h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación en el anticuerpo secundario, se lavaron las membranas con TTBS 0.01% (2x10 minutos, 5x5 minutos), en el caso de las membranas incubadas con

el anticuerpo anti-ratón, se realizó un lavado con una solución de NaCl 0.5M y Tris-HCl 20mM pH 7.4 para romper cualquier unión inespecífica a la proteína, se realizó un lavado con TBS (1x5 minutos). El revelado se realizó con el kit comercial de quimioluminiscencia Immobilon (Millipore, WBKLS) de acuerdo al fabricante.

8.9. Análisis estadístico.

Para cada uno de los grupos de estudio se determinó la distribución de los datos haciendo uso de la prueba D'Agostino y así determinar si los datos tienen distribución normal o no. Una vez determinada la normalidad el análisis de los datos se llevó a cabo haciendo uso de un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA de 2 vías) en el que se evaluaron el peso corporal y los días de tratamiento entre los diferentes grupos experimentales. Para las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales y una sola variable se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis (para datos no paramétricos) o ANOVA de una vía (para datos paramétricos) y sus correspondientes pruebas pos-hoc (Dunn o Tukey respectivamente). Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los grupos. La P menor a 0.05 fue considerada como significativa en todos los casos.

9. RESULTADOS

9.1. Caracterización de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida (HO-AAVPA)

Después de la re-cristalización del compuesto, se obtuvieron 3.5 g (70% de rendimiento) de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida como un cristal hexagonal, con un $R_f=0.56$ (Hex/AcOEt 7:3), $PF=54\pm 2^\circ C$. FT IR (ATR) ν_{max} 3309, 2958, 2932, 2872, 1606, 1549, 1447, 775, 687 cm^{-1} (Figura 11). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.73 (s, 1H, OH), 9.36 (s, 1H, NH), 7.60 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H, H-6'), 6.97 (ddd, $J = 8.0, 7.3, 1.7$ Hz, 1H, H-5'), 6.86 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H, H-3'), 6.77 (ddd, $J = 7.9, 7.3, 1.5$ Hz, 1H, H-4'), 2.58 (m, 1H, H-2), 1.54 (m, 1H, H-3), 0.7 (t, $J=3$ Hz, 6H, 2H-5). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 175.5 (CO), 148.7 (C-2'), 126.8 (C-1'), 125.4 (C-4'), 123.1 (C-6'), 119.5 (C-5'), 116.7 (C-3'), 46.0 (C-2), 35.5 (2C-3), 20.7 (2C-4), 14.5 (2C-5) (Figura 12). ESI-MS calculado para $C_{14}H_{21}NO_2$: $[M+H]^+236.1482$ obtenido: 236.168 (Figura 13).

9.1.1. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

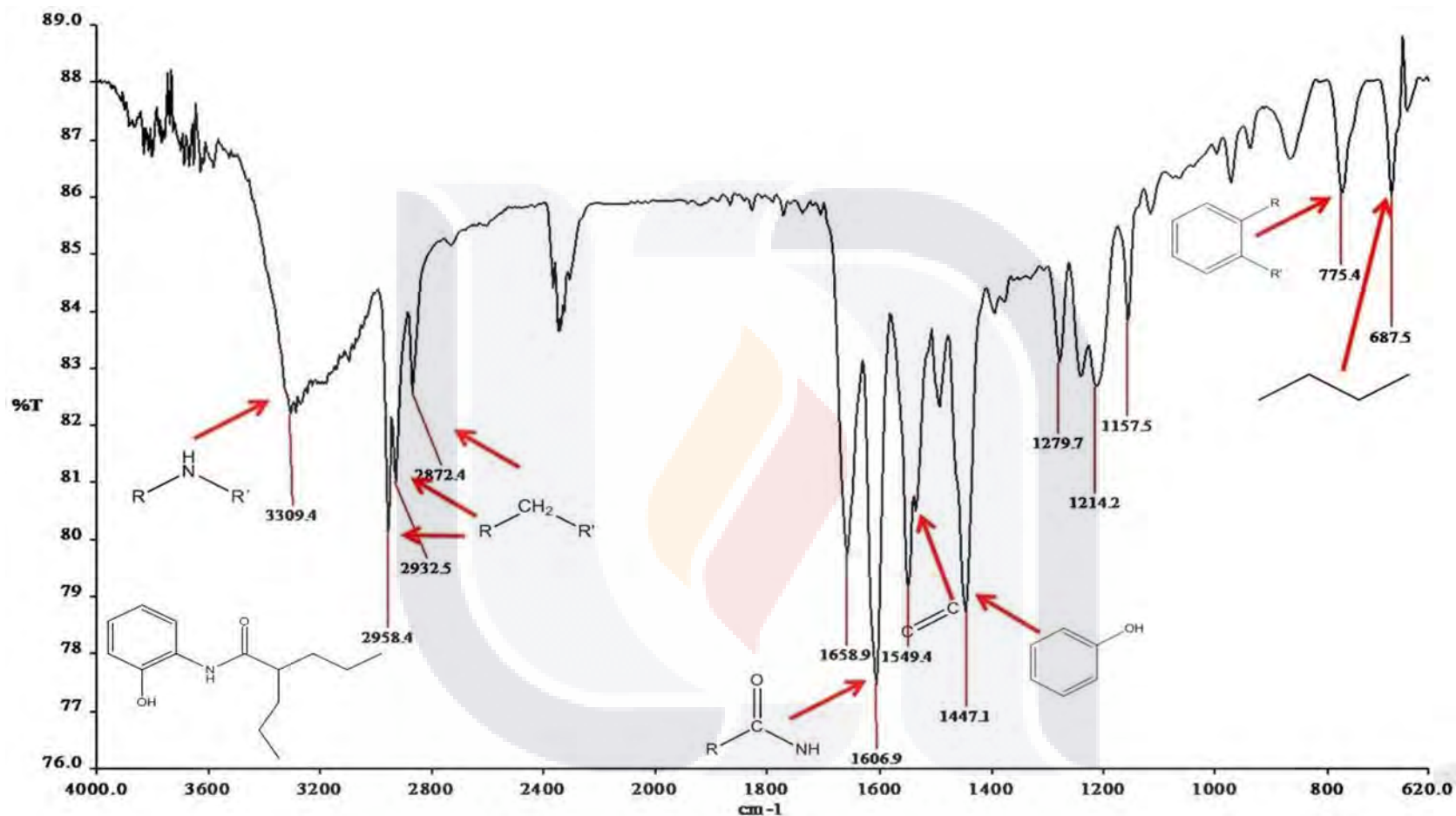


Figura 11. Análisis de espectroscopia de infrarrojo (IR) de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.

9.1.2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C).

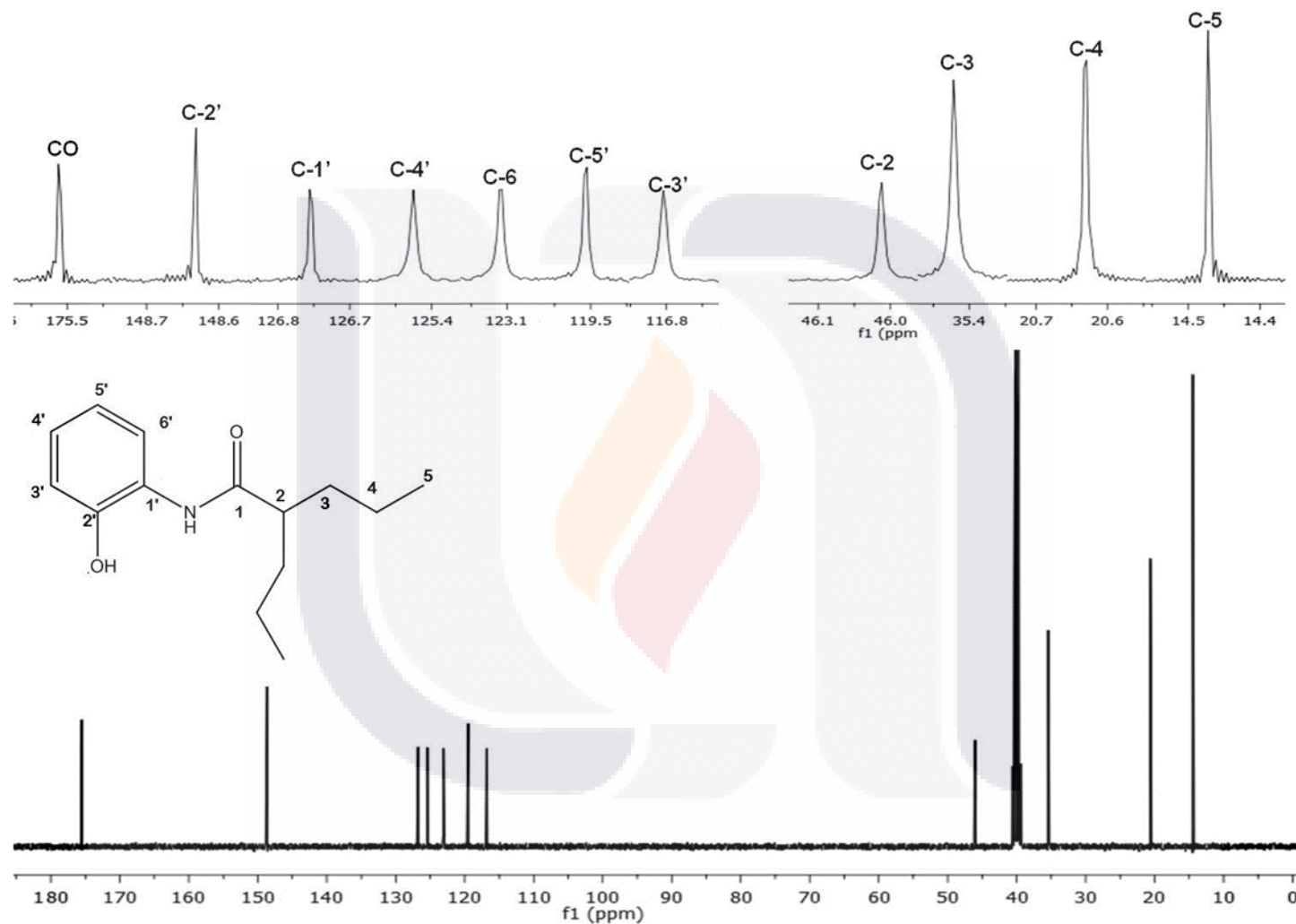


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida

9.1.3. Espectrometría de masas

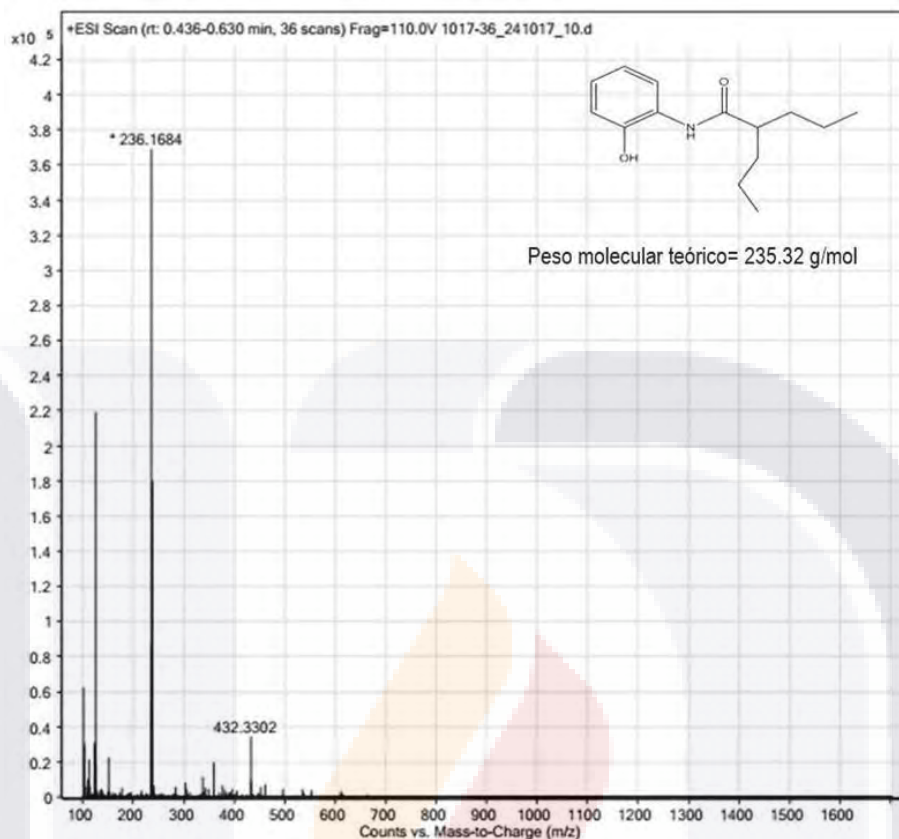


Figura 13. Análisis de espectrometría de masas. Peso molecular experimental= 236.1684

9.2. Evaluación del efecto de HO-AAVPA en el volumen tumoral

Después de la inoculación con la línea celular 4T1 en un grupo de 12 ratones hembra, el 91.6% presentó crecimiento tumoral, a la semana 1, uno de los animales se encontró muerto y a lo largo de la semana 4, otro animal falleció, el resto de los ratones fueron sacrificados 4 semanas post-inducción, obteniéndose un aumento de volumen tumoral (Figura 14). Los crecimientos más significativos comprenden a los animales 2, 4 y 12, los cuales, para la semana 4 mostraron un volumen tumoral 1 800, 112 y 538 veces mayor, respectivamente, versus la semana 1 post-inoculación. Este grupo fue utilizado para establecer el tiempo de inicio del tratamiento, el cual será considerado a la semana 1, ya que, para este día, es fácilmente medible sin presentar molestia al animal para su alimentación o zonas de necrosis tisular *per se*. Por lo que se considera el momento propicio para iniciar con el tratamiento.

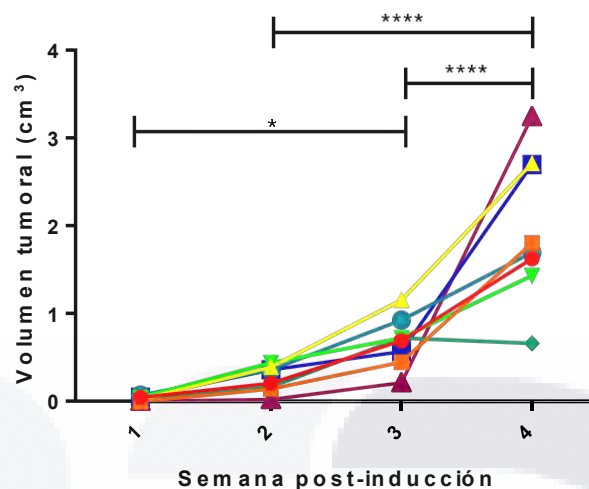


Figura 14. Desarrollo tumoral del grupo control. Representa el crecimiento tumoral de cada animal perteneciente al grupo control en el transcurso de las 4 semanas del protocolo. Se muestran diferencias significancias en el volumen tumoral de los animales del grupo en la semana 1 vs semana 3, con un valor de $*p < 0.1$; semana 3 vs semana 4, semana 2 vs semana 4 y semana 1 vs semana 4 con valor $****p < 0.0001$.

La figura 15 presenta la gráfica del porcentaje de cambio en el volumen tumoral entre la semana 1 y semana 4 (3 semanas de tratamiento), no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.

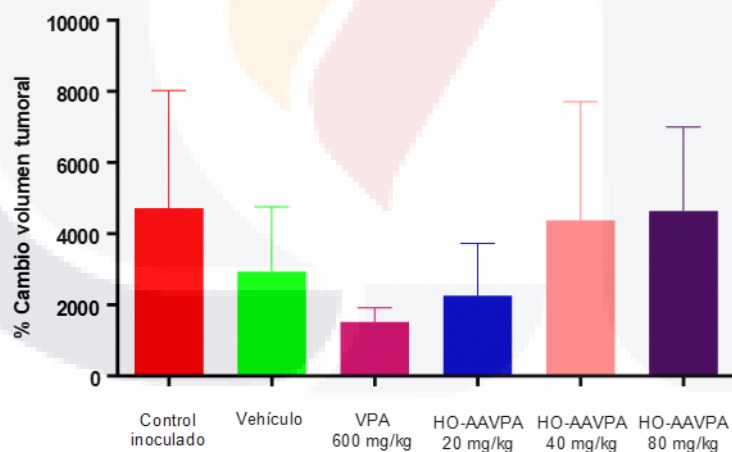
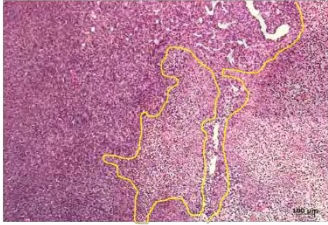
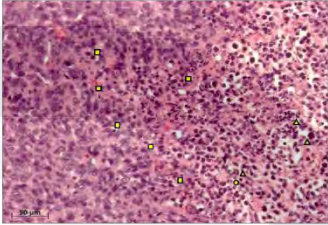

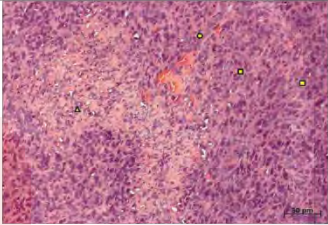
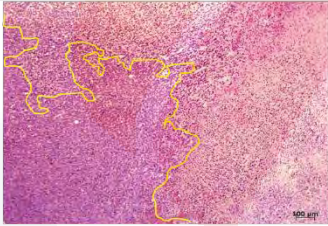
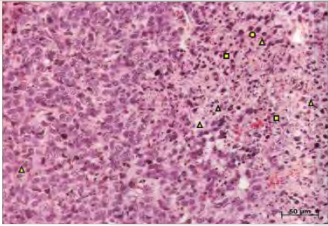

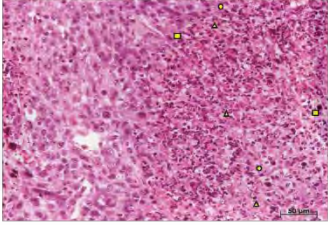

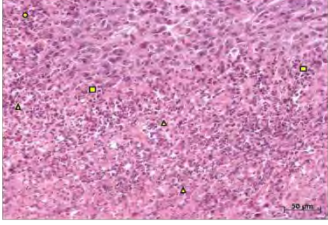
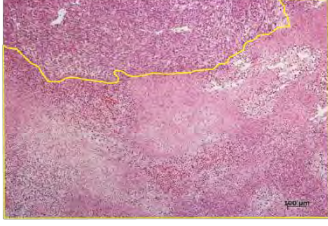
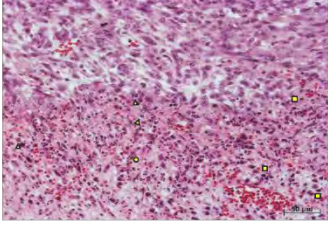


Figura 15. Cambios en el volumen tumoral. Se representan los grupos control inoculado y tratamientos con VPA e HO-AAVPA (20, 40 y 80 mg/kg) con respecto al % de cambio del volumen al final del protocolo (4 semanas post-inoculación), no se observan diferencias significativas entre El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de 1 vía con una poshoc de Tukey.

9.3. Evaluación del efecto de HO-AAVPA en el estroma tumoral

La figura 16 muestra los cambios tisulares en respuesta al tratamiento vs los controles, observándose zonas de muerte celular amplias rodeadas de células tumorales viables en los grupos control VPA (Figura 16.1c) y las diversas dosis de HO-AAVPA (Figura 16.1d-1f). Siendo evidentes cambios morfológicos con pycnosis nuclear, vacuolización citoplasmática y áreas acelulares en respuesta al tratamiento (fig.16.2c- 2f).

GRUPOS	ÁREA DE MUERTE ⁽¹⁾	CAMBIOS CELULARES ⁽²⁾
TUMOR INOCULADO ^(a)		
VEHICULO ^(b)		
VPA (600 mg/kg) ^(c)		
HO-AAVPA 20 mg/kg ^(d)		
HO-AAVPA 40 mg/kg ^(e)		
HO-AAVPA 80 mg/kg ^(f)		

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 16. Cambios estromales y morfológicos en respuesta a HO-AAVPA. Los cambios estromales son evidentes en la tinción de hematoxilina y eosina (1a- 1g) observándose áreas de muerte celular rodeadas de zonas con células viables. Las modificaciones morfológicas incluyen vacuolización citoplasmática (flechas), núcleos picnóticos (cuadrados), cariólisis (triángulo) and cariorrexis (circulo) (2a-2g). Magnificación 10x y 20x.

9.4. Cambios morfológicos de tejido hepático en respuesta a VPA y HO-AAVPA.

La figura 17 muestra las microfotografías obtenidas mediante tinciones de H&E y PAS de tejido hepático muestran cambios morfológicos contrastantes entre los tratamientos evaluados. En el grupo tratado con VPA se observaron infiltrados inflamatorios mixtos, visibles alrededor de la tríada portal (Figura 17.1), así como alteraciones hepáticas marcadas, caracterizadas por esteatosis macro y microvesicular (Figura 17.2) (flechas negras). Estas características reflejan un daño hepático significativo asociado a la exposición al fármaco. En contraste, los tejidos provenientes de los grupos tratados con HO-AAVPA mostraron una esteatosis mínima o de bajo grado y ausencia de infiltrados relevantes, lo cual sugiere un perfil de seguridad hepática más favorable (Figura 17.1). En las tinciones PAS, se evidenció un aumento en los depósitos de glucógeno (señalados con flechas amarillas), particularmente en las dosis de 40 y 80 mg/kg (Figuras 17.2). Este patrón indica una modificación en el metabolismo hepático sin llegar a representar un daño estructural comparable al observado con VPA.

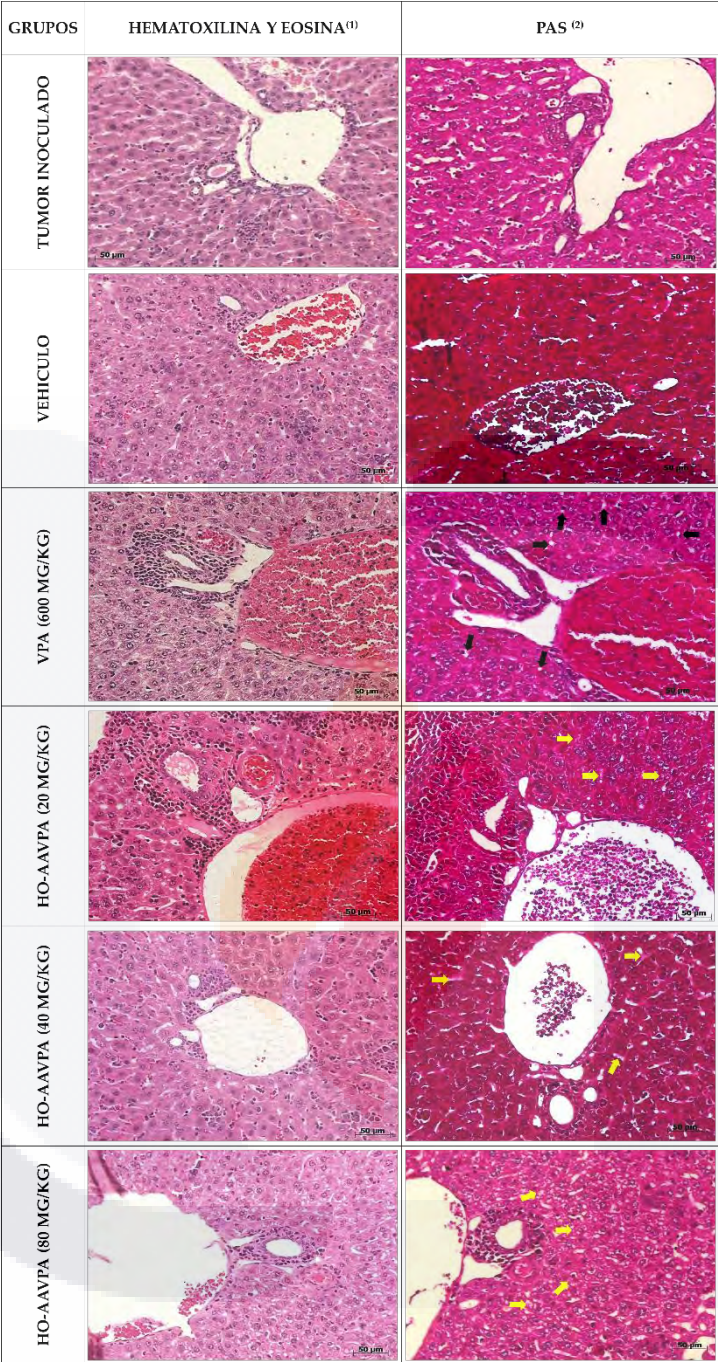


Figura 17. Cambios morfológicos en el tejido hepático. Los hepatocitos muestran esteatosis micro y macrovesicular (flechas negras) en el tratamiento con VPA, así como depósitos de glucógeno (flechas amarillas) en los grupos tratados con 20, 40 y 80 mg/kg de HO-AAVPA, evidenciando espacios entre la membrana celular y el núcleo.

9.5. Cambios en la fibrosis del estroma tumoral por efecto de VPA y HO-AAVPA

La Figura 18 muestra la evaluación comparativa de la fibrosis mediante tres técnicas histológicas: tinción tricrómica de Masson, rojo sirio bajo luz blanca y rojo sirio bajo luz

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

polarizada. En la tinción tricrómica de Masson (Figura 18.1) se observan fibras colágenas teñidas en tonalidades azules, distribuidas de manera dispersa a lo largo del tejido. En contraste, la tinción con rojo sirio bajo luz blanca (Figura 18.2) evidencia las fibras colágenas en tonos rojos, permitiendo una delimitación más clara de las áreas con mayor deposición. Por su parte, el análisis con rojo sirio bajo luz polarizada (Figura 18.3) muestra las fibras de colágena con birrefringencia característica, evidenciándose en tonalidades rojo brillante y verde sobre un campo oscuro, lo que facilita la diferenciación entre colágena tipo I (rojo-anaranjado) y tipo III (verde).

En los grupos control inoculado y vehículo, las tres técnicas revelan una abundante presencia de fibras colágenas distribuidas en forma de racimos, observándose extensas áreas de depósito tanto de colágena tipo I como tipo III (Figura 18.2a-b). En contraste, los animales tratados con VPA (600 mg/kg) y con HO-AAVPA en dosis de 20, 40 y 80 mg/kg (Figura 18c-f) presentan una disminución notable en la deposición de colágeno. Esta reducción es especialmente evidente en las tinciones con rojo sirio bajo luz polarizada, donde la intensidad y extensión de las fibras birrefringentes es considerablemente menor en comparación con los controles (Figura 18.3c-f). La disminución en la fibrosis resulta más marcada en los grupos tratados con VPA y con HO-AAVPA en el rango de 20 a 80 mg/kg, donde se aprecia una reducción sustancial en la distribución de fibras colágenas dispersas en el tejido, lo que sugiere un efecto antifibrótico dependiente de la dosis.

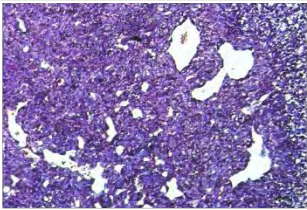
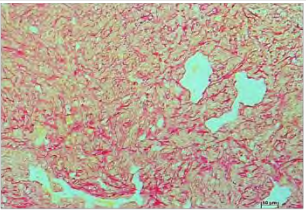

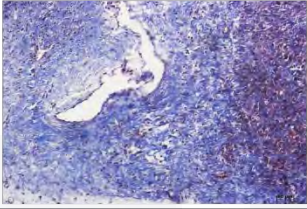
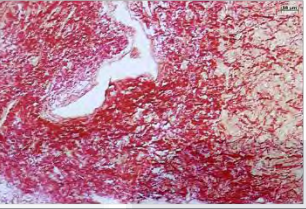
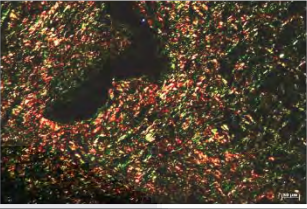
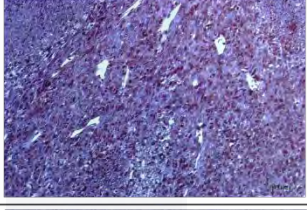

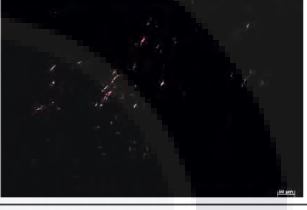
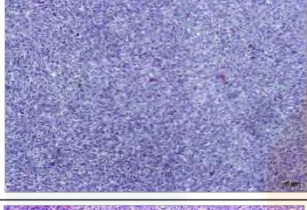

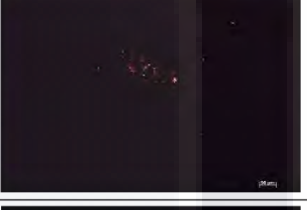
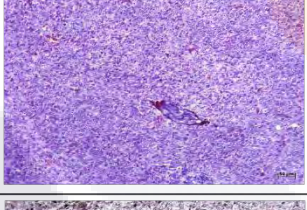
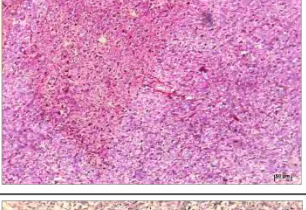
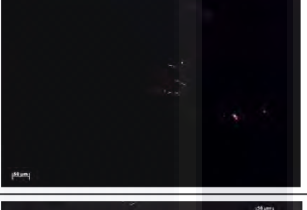


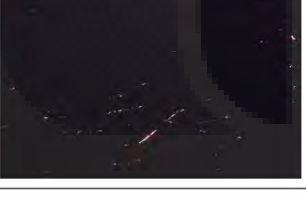
GRUPOS	TRICRÓMICA DE MASSON ⁽¹⁾	ROJO SIRIO ⁽²⁾	ROJO SIRIO (LUZ POLARIZADA) ⁽³⁾
TUMOR INOCULADO (a)			
VEHICULO (b)			
VPA (600 mg/kg) (c)			
HO-AAVPA 20 mg/kg (d)			
HO-AAVPA 40 mg/kg (e)			
HO-AAVPA 80 mg/kg (f)			

Figura 18. Evaluación de fibrosis tumoral. La tinción de tricrómica de Masson (1a-f), rojo sirio con luz blanca (2a-f) y rojo sirio con luz polarizada (3a-f) muestran una disminución de los depósitos de colágeno intratumoral en los grupos 20, 40 y 80 mg/kg.

La figura 19 muestra las unidades relativas de fibrosis, se observa una disminución significativa del 95.1, 95.3, 93.5, 93.2% en los grupos VPA, 20, 40y 80 mg/kg HO-AAVPA con respecto al control vehículo y del 80, 80.6, 99.9 y 72.2% versus el control inoculado. En conjunto, estos hallazgos demuestran el potencial antifibrótico de HO-AAVPA en comparación con la alta

producción de fibrosis inducida por el vehículo (Figura 28).

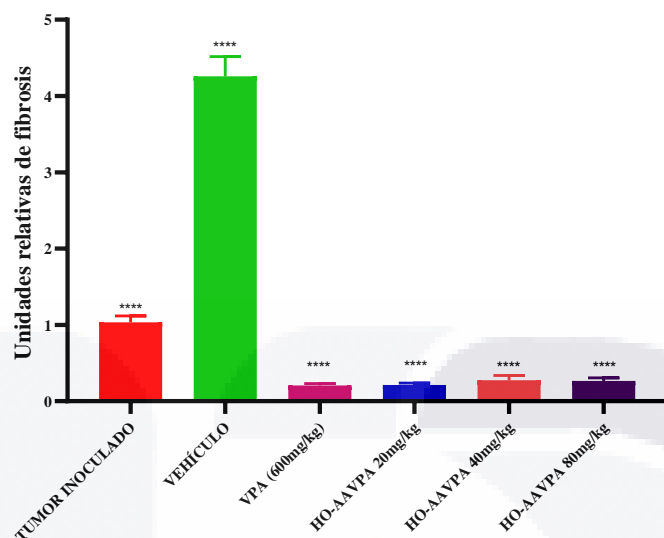


Figura 19. Evaluación del efecto de HO-AAVPA y VPA en la fibrosis tumoral. La cuantificación de la fibrosis en los grupos experimentales (unidades relativas) mostró una reducción significativa de la fibrosis en los grupos tratados con VPA y HO-AAVPA en comparación con el grupo control con tumor. Además, todos los tratamientos (VPA y HO-AAVPA a 20, 40 y 80 mg/kg) presentaron niveles de fibrosis significativamente menores en comparación con el grupo vehículo. HO-AAVPA a 20 y 40 mg/kg redujo la fibrosis 8.76 y 8.79 veces, respectivamente, en comparación con el grupo tumor inoculado. Por su parte, VPA y HO-AAVPA (20, 40 y 80 mg/kg) mostraron reducciones de 9.58, 9.65, 9.66 y 9.31 veces, respectivamente, en comparación con el grupo vehículo, mostrando significancia con valores de **** $p < 0.0001$. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida del análisis post hoc de Dunn.

9.6. Efecto de VPA y HO-AAVPA en la expresión de HDAC1 y α -SMA en tejido tumoral

Inmunofluorescencia evidencia la expresión de diferentes proteínas de interés, la imagen compuesta por los tres canales (merge) (Figura 20a), la tinción de Hoechst (azul) para evidenciar núcleos celulares (Figura 20b), la expresión de HDAC1 (puntilleo color verde brillante) (Figura 20c), así como la α -SMA en el citoplasma de los fibroblastos activados (FACs) (rojo) (Figura 20d) en los diferentes grupos experimentales.

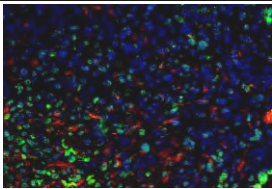
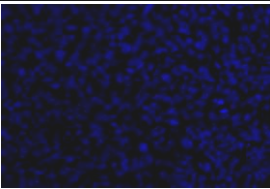
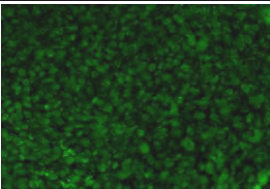
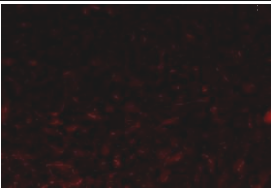
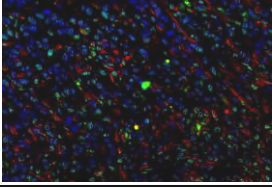
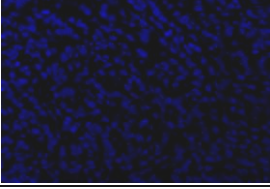
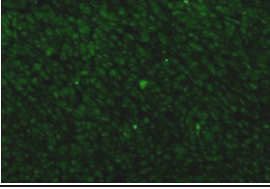
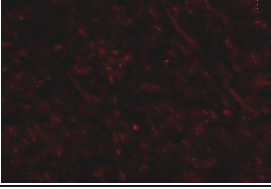
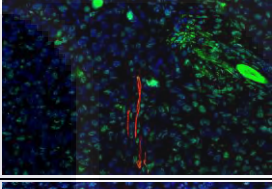
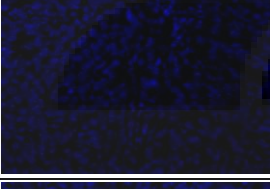
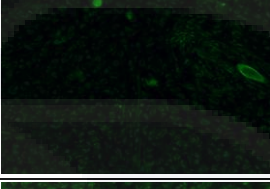
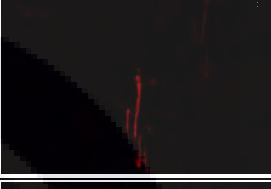
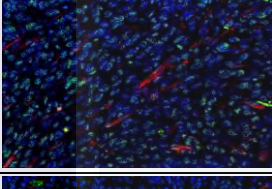
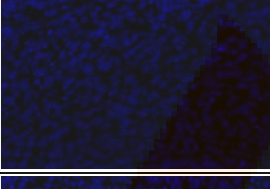
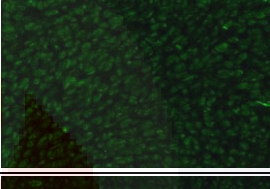
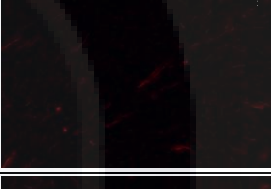
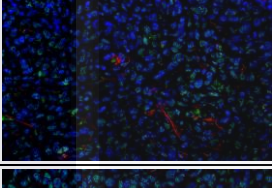
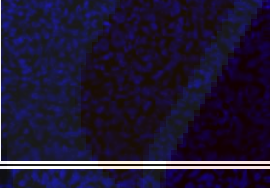
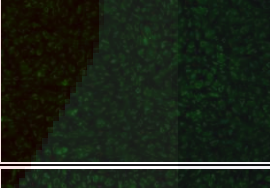
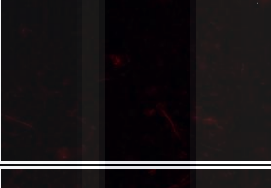
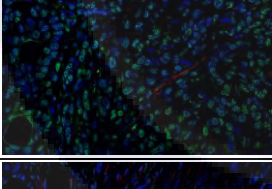
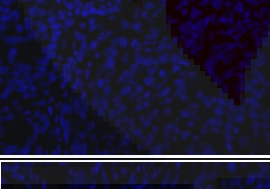
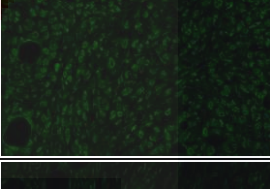
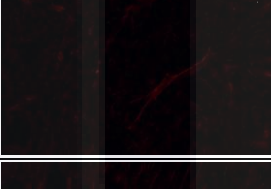
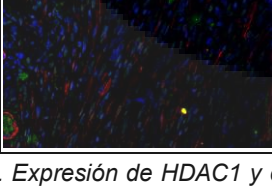
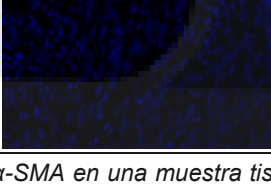

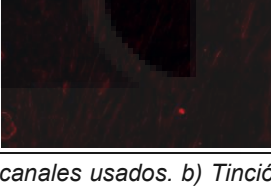
Grupos	MERGE ^(a)	HOESCHT ^(b)	ALEXA 488 ^(c)	RODAMINA ^(d)
Tumor inoculado				
Vehículo				
VPA 600 mg/Kg				
HO-AAVPA (20mg/kg)				
HO-AAVPA (40mg/kg)				
HO-AAVPA (80mg/kg)				
HO-AAVPA (160mg/kg)				

Figura 20. Expresión de HDAC1 y α-SMA en una muestra tisular. a) Merge de los tres canales usados. b) Tinción nuclear con Hoechst. c) Fluorescencia específica del fluorocromo Alexa 488 en el núcleo celular evidenciando la expresión de HDAC1. d) Fluorescencia en color rojo característica de la rodamina, mostrando la expresión de α-SMA en la membrana de fibroblastos activados, que presentan una morfología alargada y dentada. Magnificación 20x.

La figura 21 muestra un aumento significativo en el número de células que expresan La enzima HDAC1 en los grupos control vehículo, VPA, 20, 40 y 80 mg/kg HO-AAVPA respecto al control y del grupo 160 mg/

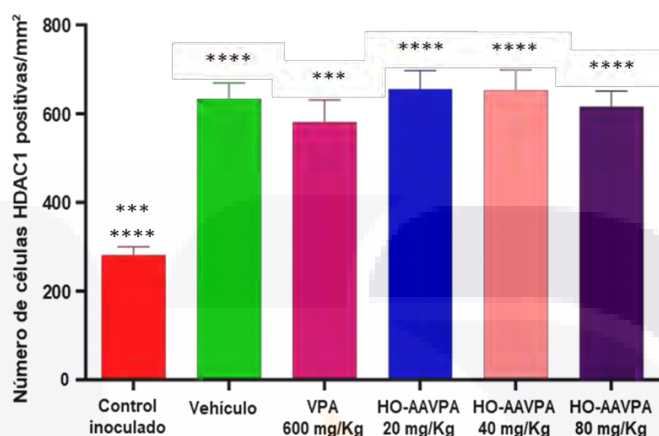


Figura 21. Número de células que expresan HDAC1 en tejido tumoral. Se observaron diferencias significativas entre el grupo control inoculado y los grupos vehículo y HO-AAVPA (**** $p < 0.0001$), así como entre el grupo control inoculado y el grupo tratado con VPA (*** $p < 0.0005$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey.

La figura 22 muestra el efecto de los inhibidores de HDAC (VPA e HO-AAVPA) sobre el número de fibroblastos asociados a cáncer que expresan α -SMA ($FAC^{\alpha-SMA+}$), disminuyéndolo de manera significativa en todos los grupos tratados con iHDAC con respecto al grupo vehículo y control inoculado.

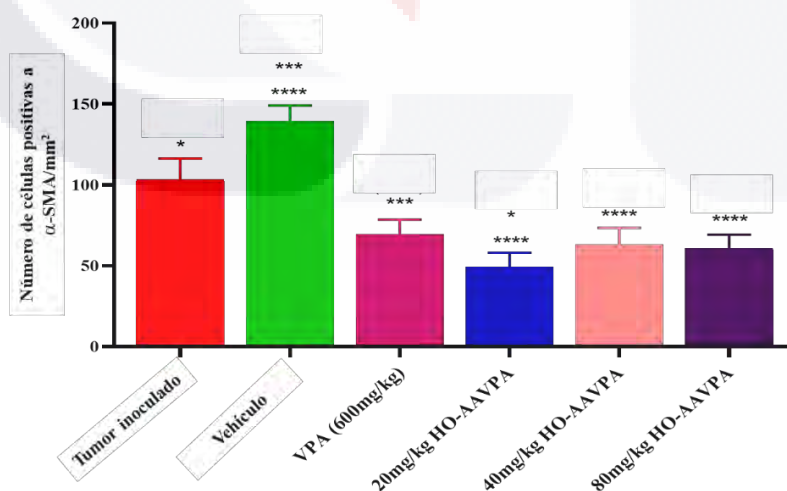


Figura 22. Número de células que expresan α -SMA en tejido tumoral. Se observa un decremento significativo en la expresión de α -SMA en los grupos VPA y HO-AAVPA (20, 40 y 80 mg/kg) vs el vehículo y del grupo 20 mg/kg vs el control inoculado. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.005$ y * $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y un post hoc de Dunn.

9.7. Efecto de VPA y HO-AAVPA en la expresión de colágeno 1 y GPER

Se evaluó la expresión de COL1A1 y GPER1 en los tejidos tumorales (Figura 23a). Los análisis por *Western blot* mostraron que los tratamientos con HDACi disminuyeron de manera significativa la expresión de COL1A1 (Figura 23b). En cuanto a GPER1, su expresión se redujo de forma más pronunciada con las dosis de 40 y 80 mg/kg de HO-AAVPA en comparación con la dosis de 20 mg/kg, aunque sin diferencias significativas respecto a los demás grupos (Figura 23c).

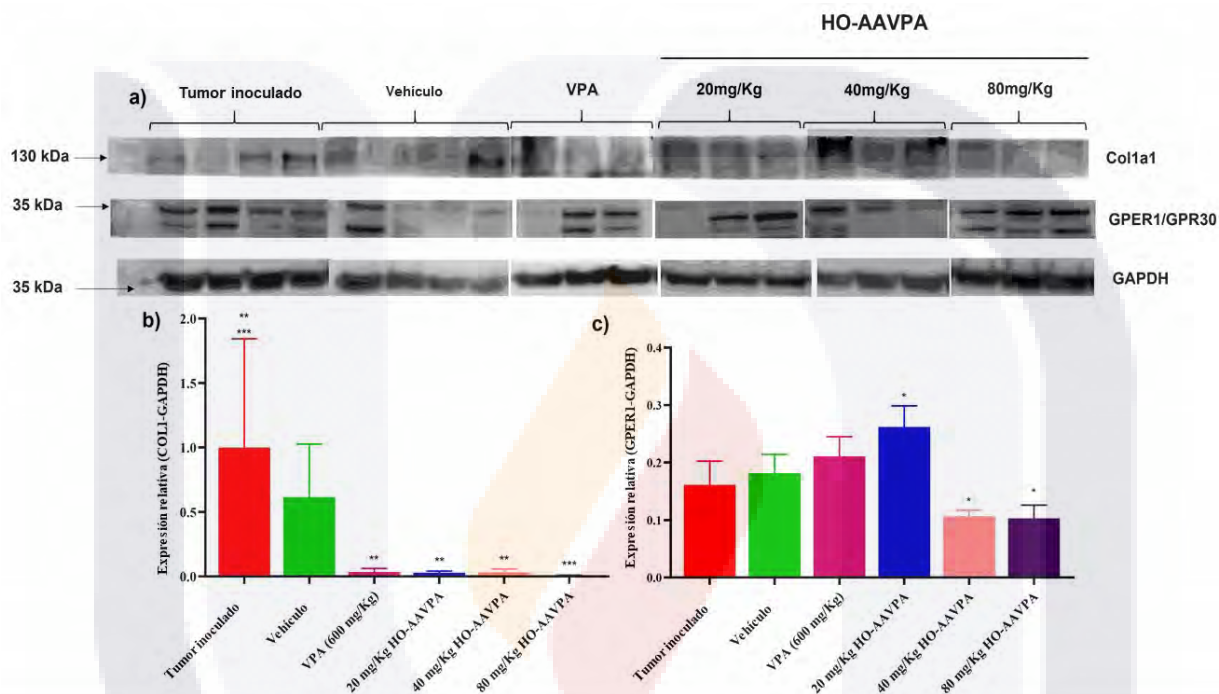


Figura 23. Expresión de GPER1 y COL1 analizada por Western blot en tejido tumoral. a) Inmunodetección de los lisados totales obtenidos de los tejidos tumorales de los distintos grupos experimentales. Para el ensayo de Western blot se emplearon anticuerpos anti-GAPDH, anti-COL1 y anti-GPER1. b) Cambios de expresión (fold change) de COL1. c) Cambios de expresión (fold change) de GPER1, analizados con el programa Image-Lab™. Los datos se presentan como media ± D.E. de los grupos experimentales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. Los valores de ***p < 0.001, **p < 0.005 y *p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

10. DISCUSIÓN

10.1. Síntesis, purificación y caracterización del compuesto HO-AAVPA

En este estudio se logró la síntesis, purificación y caracterización estructural del compuesto HO-AAVPA, siguiendo la ruta sintética descrita previamente por Prestegui-Martel (2016) (Prestegui-Martel et al., 2016) (Figura 10). El producto obtenido presentó una morfología cristalina en forma de agujas delgadas y opacas, coherente con lo reportado para sus análogos arilamídicos. La identidad química del compuesto fue confirmada mediante los análisis de

espectroscopía infrarroja (IR) (Figura 11), resonancia magnética nuclear (RMN) (Figura 12) y HPLC-MS (Figura 13), cuyos resultados corroboraron la presencia de los grupos funcionales esperados y la integridad de la estructura propuesta. Estos hallazgos validan la correcta obtención del HO-AAVPA y sientan las bases para la evaluación de sus propiedades biológicas en los modelos experimentales empleados.

10.2. Evaluación del efecto de VPA e HO-AAVPA en el tejido tumoral

Los cambios morfológicos observados en las células tumorales y en el estroma constituyen indicadores relevantes de malignidad. Para evaluar el grado tumoral se empleó la escala SBR (puntaje máximo: 9), mediante la cual se confirmó que los tejidos analizados presentaron características propias de un carcinoma de alto grado. Este sistema considera tres criterios: formación de túbulos (<10%, 3 puntos), pleomorfismo nuclear (variación marcada = 3 puntos) e índice mitótico (>10 mitosis atípicas en 10 campos = 3 puntos) (Amat et al., 2002; Elston y Ellis 1991). El tratamiento con VPA y HO-AAVPA provocó modificaciones celulares y estromales; sin embargo, las diferencias en el tamaño de las zonas de muerte celular y en el crecimiento tumoral entre las distintas dosis no fueron significativas. Aun así, los resultados sugieren una correlación entre la dosis, la duración del tratamiento y los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de los HDACi. En un estudio in vitro, Prestegui-Martel et al. (2016) reportaron un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración de OH-AAVPA en diversas líneas celulares de cáncer de mama. Las discrepancias entre los resultados in vitro e in vivo podrían explicarse porque, en condiciones in vitro, el compuesto alcanza de forma inmediata sus blancos biológicos, mientras que en modelos in vivo debe atravesar barreras fisiológicas para llegar al tumor. Adicionalmente, las variaciones genéticas, epigenéticas, metabólicas y fisiológicas influyen en la respuesta farmacológica observada (Figura 16).

10.3. Cambios en el parénquima hepático en respuesta a HDACi.

Los HDACi representan una estrategia consolidada en el tratamiento del cáncer. Fármacos como vorinostat (SAHA), romidepsina (FK228), belinostat (PXD101) y panobinostat (LBH589) han sido aprobados por agencias regulatorias internacionales para el tratamiento de CTCL, PTCL y mieloma múltiple. De manera similar, la chidamida (CS055), aprobada en China, ha mostrado eficacia en PTCL y cáncer de mama avanzado (Liang et al., 2023). No obstante, se han documentado efectos adversos importantes, entre ellos la hepatotoxicidad inducida por VPA, la cual se relaciona con la generación de especies reactivas de oxígeno derivadas de su β -oxidación mitocondrial (Abbott y Anari 1999; Löscher 1999). Este proceso ocasiona

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

agotamiento del glutatión hepático y estrés oxidativo. Estudios previos han descrito esteatosis microvesicular en hepatocitos aislados y biopsias de animales expuestos a 4-ene-VPA (Tang et al., 1995), así como esteatosis macro y microvesicular en pacientes epilépticos bajo tratamiento prolongado (Sato et al., 2005). En este estudio, los animales tratados con VPA mostraron cambios microvesiculares en hepatocitos (Figura 17) y un incremento en la mortalidad tras dos semanas de tratamiento, lo cual confirma su toxicidad hepática. No obstante, parte de las vesículas observadas podrían deberse a acumulación de glucógeno, ya que la inhibición de HDAC1 reduce la expresión de PEPCK y HNF-4 α , ambos reguladores del metabolismo glucídico (Oiso et al., 2011; Xie et al., 2009). La acumulación de glucógeno presenta características histológicas distintas de la presencia de lípidos, lo que podría explicar algunas de las observaciones realizadas (Hardisty y Brix, 2005).

10.4. Expresión de HDAC1 y α -SMA en respuesta a HO-AAVPA y VPA

El efecto inhibitor de HO-AAVPA sobre HDAC1 (Sixto-López et al., 2020a; Sixto-López et al., 2020b) redujo el número de fibroblastos positivos a α -SMA (Figura 22). Dado que los fibroblastos activados promueven la EMT y la progresión tumoral (Kim et al., 2018), la disminución de esta población sugiere un impacto directo sobre el microambiente tumoral. Kim et al. (2018) demostraron que el HDACi Scriptaid antagoniza la señalización mediada por TGF- β en CAFs, disminuye la deposición de proteínas de la MEC y, con ello, reduce la rigidez del estroma y retrasa el crecimiento tumoral. Asimismo, se ha reportado que Trichostatin A, un inhibidor de HDAC de clase I y II, suprime la EMT en células epiteliales renales (Yoshikawa et al., 2007). En este estudio, la inhibición de la fibrosis observada con HO-AAVPA (Figuras 21) sugiere una reducción de la actividad de los CAFs (Guo et al., 2009), contribuyendo posiblemente a revertir el microambiente protumoral mediante una disminución en los procesos mecanosensoriales de CAFs y células tumorales.

10.5. Cambios en la fibrosis intratumoral en respuesta a tratamientos con HDACi

La disminución del efecto antifibrótico en la dosis más alta de HO-AAVPA (80 mg/kg) podría explicarse por la inducción de P-glicoproteína (P-gp), proteína capaz de expulsar fármacos anticancerígenos, cuya expresión puede aumentar tras el uso de inhibidores de HDAC1 (Figuras 18-19) (Kim et al., 2009; Wang et al., 2016). De acuerdo con lo descrito por Ramírez-Farías et al. (2021), la interacción entre células tumorales y CAFs puede favorecer un incremento de fibrosis, lo que coincide con lo observado (Figuras 22). La acumulación de colágeno se ha asociado también con resistencia al tamoxifeno (Jansen et al., 2005; Ramírez-

Farías et al., 2021). Además, genes relacionados con la MEC, como *COL1A1*, se encuentran alterados en cáncer de mama avanzado, fenómeno vinculado con mayor capacidad invasiva y mayor reclutamiento de células estromales (Jansen et al., 2005; Kim et al., 2014; Matossian et al., 2018). Por ello, la disminución de *COL1A1* inducida por HO-AAVPA podría constituir una estrategia terapéutica útil en pacientes resistentes a terapias de primera línea debido a una elevada rigidez estromal. En concordancia, Chiu et al. (2013) demostraron que SAHA combinado con radiación inhibió el crecimiento tumoral y redujo las metástasis pulmonares en un modelo de TNBC.

10.6. Efecto de HO-AAVPA en la expresión de GPER1

El papel de GPER1 en la progresión del cáncer de mama permanece poco claro; sin embargo, su participación en la biología del TNBC lo posiciona como un posible blanco terapéutico. Estudios previos han documentado un aumento de su expresión en CAFs, lo cual favorece su proliferación, migración y cambios asociados con EMT (Hsu et al., 2019). No obstante, otros estudios han mostrado que la activación de GPER1 por G-1 suprime la proliferación tumoral y la EMT de manera dependiente de la concentración (Chen et al., 2016; Weißenborn et al., 2014). En este trabajo, los tumores tratados con HO-AAVPA mostraron un aumento en la expresión de GPER1 en el grupo de 20 mg/kg, seguido de una disminución en las dosis superiores (Figura 23a-b). Cabe destacar que algunos HDACis han demostrado reducir la expresión de GPER1 en estudios *in vitro* (Imesch et al., 2013; Prestegui-Martel et al., 2024). A pesar de ello, su modulación podría tener beneficios sobre la EMT, como lo proponen De Francesco et al. (2018), aunque también se ha reportado que la sobreexpresión de GPER1 puede asociarse con rutas pro-metastásicas (De Francesco et al., 2018; Xu et al., 2022). Las diferencias entre los modelos *in vitro* e *in vivo* podrían deberse al metabolismo diferencial del compuesto. En consecuencia, se requieren estudios adicionales que permitan esclarecer el papel de GPER1 en la modificación de la EMT, la progresión del TNBC y la posible resensibilización terapéutica.

11. CONCLUSIONES

El modelo animal de TNBC mostró desarrollo tumoral cinco días después de la inoculación, acompañado de una disminución progresiva del peso corporal. Tras 21 días de tratamiento con HDACis se observó un efecto antifibrótico, posiblemente asociado con la inhibición de la vía del TGF- β . El efecto antiproliferativo pudo relacionarse con manifestaciones morfológicas propias

de apoptosis, como picnosis, cariólisis y cariorrexis. HO-AAVPA no generó alteraciones hepáticas y, además, pareció sensibilizar las células tumorales.

El efecto antiproliferativo relacionado con la activación de GPER1 podría aprovecharse como herramienta terapéutica en etapas tempranas de TNBC. Asimismo, los agonistas de GPER1 podrían inducir efectos anticancerígenos al aumentar la expresión del receptor.

Finalmente, aunque la cantidad de células positivas a HDAC1 aumentó, esto podría representar un mecanismo compensatorio. La disminución de CAFs positivos a α -SMA y la reducción de fibrosis apoyan que, pese al incremento en la expresión de la enzima, su actividad continúa inhibida, como lo evidencia la menor deposición de colágeno.

12. REFERENCIAS

1. Abbott, Frank S., y M. Reza Anari. 1999. "Chemistry and Biotransformation". En Valproate, editado por Wolfgang Löscher. Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8759-5_3.
2. Amat, Sophie, Frederique Penault-Llorca, Hervew Cure, et al. 2002. "Scarff-Bloom-Richardson (SBR) Grading: A Pleiotropic Marker of Chemosensitivity in Invasive Ductal Breast Carcinomas Treated by Neoadjuvant Chemotherapy". *International Journal of Oncology* 20 (4): 791–96.
3. Anderberg, C., & Pietras, K. (2009). On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*, 8(10), 1461-1462. doi: 10.4161/cc.8.10.8557
4. Angelucci, A., A. Valentini, D. Millimaggi, G. L. Gravina, R. Miano, V. Dolo, C. Vicentini, M. Bologna, G. Federici and S. Bernardini (2006). "Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways." *Anticancer Drugs* 17(10): 1141- 1150.
5. Arendt, L. M., Rudnick, J. A., Keller, P. J., & Kuperwasser, C. (2010). Stroma in breast development and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 21(1), 11-18. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.10.003
6. Barbarotta, L., & Hurley, K. (2015). Romidepsin for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma. *J Adv Pract Oncol*, 6(1), 22-36.
7. Barcus, C. E., Keely, P. J., Eliceiri, K. W., & Schuler, L. A. (2013). Stiff collagen matrices increase tumorigenic prolactin signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 288(18), 12722-12732. doi: 10.1074/jbc.M112.447631
8. Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev and K. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." *Cell* 129(4): 823-837.
9. Bartoschek, M., Oskolkov, N., Bocci, M., Lovrot, J., Larsson, C., Sommarin, M., . . . Pietras, K. (2018). Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat Commun*, 9(1), 5150. doi: 10.1038/s41467-018- 07582-3
10. Bauer, M., Su, G., Casper, C., He, R., Rehrauer, W., & Friedl, A. (2010). Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*, 29(12), 1732-1740. doi: 10.1038/onc.2009.463
11. Baulida, J. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts. *Mol Oncol*, 11(7), 847-859. doi: 10.1002/1878-0261.12080
12. Baylin, S. B. and J. E. Ohm (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" *Nat Rev Cancer* 6(2): 107-116.
13. Bermudez-Lugo, J. A., O. Perez-Gonzalez, M. C. Rosales-Hernandez, I. Ilizaliturri-Flores, J. Trujillo-Ferrara and J. Correa-Basurto (2012). "Exploration of the valproic acid binding site on histone deacetylase 8 using docking and molecular dynamic simulations." *J Mol Model* 18(6): 2301-2310.
14. Bernstein, B. E., A. Meissner and E. S. Lander (2007). "The mammalian epigenome." *Cell* 128(4): 669-681.

15. Biffi, G., & Tuveson, D. A. (2021). Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev*, 101(1), 147-176. doi: 10.1152/physrev.00048.2019
16. Bissell, Mina J., Hall, H. Glenn, & Parry, Gordon. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology*, 99(1), 31-68. doi: 10.1016/0022-5193(82)90388-5
17. Bjerling, P., R. A. Silverstein, G. Thon, A. Caudy, S. Grewal and K. Ekwall (2002). "Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity (vol 22, pg 2170, 2002)." *Molecular and Cellular Biology* 22(14): 5257-5258.
18. Bjornsson, H. T., M. I. Sigurdsson, M. D. Fallin, R. A. Irizarry, T. Aspelund, H. Cui, W. Yu, M. A. Rongione, T. J. Ekstrom, T. B. Harris, L. J. Launer, G. Eiriksdottir, M. F. Leppert, C. Sapienza, V. Gudnason and A. P. Feinberg (2008). "Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering." *JAMA* 299(24): 2877-2883.
19. Blaheta, R. A., H. Nau, M. Michaelis and J. Cinatl, Jr. (2002). "Valproate and valproate- analogues: potent tools to fight against cancer." *Curr Med Chem* 9(15): 1417-1433.
20. Boelens, M. C., Wu, T. J., Nabet, B. Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T., . . . Minn, A. J. (2014). Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*, 159(3), 499-513. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.051
21. Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5(9), 769-784. doi: 10.1038/nrd2133
22. Boyd, N. F., Dite, G. S., Stone, J., Gunasekara, A., English, D. R., McCredie, M. R., . . . Hopper, J. L. (2002). Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med*, 347(12), 886-894. doi: 10.1056/NEJMoa013390
23. Buchsbaum, R. J., & Oh, S. Y. (2016). Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers (Basel)*, 8(2). doi: 10.3390/cancers8020019
24. Buggy, J. J., M. L. Sideris, P. Mak, D. D. Lorimer, B. McIntosh and J. M. Clark (2000). "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8." *Biochemical Journal* 350: 199- 205.
25. Calle, E. E. and R. Kaaks (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." *Nat Rev Cancer* 4(8): 579-591.
26. Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., . . . Sahai, E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 15(6), 637-646. doi: 10.1038/ncb2756
27. Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T. G., . . . Lisanti, M. P. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle*, 11(12), 2285-2302. doi: 10.4161/cc.20718
28. Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman,

H. S. Earp and R. C. Millikan (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." *JAMA* 295(21): 2492-2502.

29. Carey, L. A., E. C. Dees, L. Sawyer, L. Gatti, D. T. Moore, F. Collichio, D. W. Ollila, C. I. Sartor, M. Graham and C. M. Perou (2007). "The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes." *Clin Cancer Res* 13(8): 2329-2334.

30. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, C. (2019). "Información estadística." Retrieved 14 November 2019, from http://cnegsr.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/CancerdelaMujer/InfEstad.html

31. Chateauvieux, S., F. Morceau, M. Dicato and M. Diederich (2010). "Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid." *J Biomed Biotechnol* 2010.

32. Chen, F., Long, Q., Fu, D., Zhu, D., Ji, Y., Han, L., . . . Sun, Y. (2018). Targeting SPINK1 in the damaged tumour microenvironment alleviates therapeutic resistance. *Nat Commun*, 9(1), 4315. doi: 10.1038/s41467-018-06860-4

33. Chen, Zhuo-Jia, Wei Wei, Guan-Min Jiang, et al. 2016. "Activation of GPER Suppresses Epithelial Mesenchymal Transition of Triple Negative Breast Cancer Cells via NF- κ B Signals". *Molecular Oncology* 10 (6): 775–88. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.002>.

34. Cheng, Y. C., H. Lin, M. J. Huang, J. M. Chow, S. Lin and H. E. Liu (2007). "Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia." *Leukemia Research* 31(10): 1403-1411.

35. Chiu, H. W., Yeh, Y. L., Wang, Y. C., Huang, W. J., Chen, Y. A., Chiou, Y. S., . . . Wang, Y. J. (2013). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, enhances radiosensitivity and suppresses lung metastasis in breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(10), e76340. doi: 10.1371/journal.pone.0076340

36. Choi, J., Kim, D. H., Jung, W. H., & Koo, J. S. (2013). Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res*, 15(5), R78. doi: 10.1186/bcr3472

37. Claude-Taupin, A., M. Boyer-Guittaut, R. Delage-Mourroux and E. Hervouet (2015). "Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies." *Methods Mol Biol* 1238: 487-509.

38. Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., . . . Mehta-Grigoriou, F. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, 33(3), 463-479 e410. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.011

39. Cunha, G. R. (2008). Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation*, 76(6), 578-586. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00290.x

40. Cupić, D. F., Tesar, E.C., Ilijas, K.M., Nemrava, J., & Kovacević, M. (2011). Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. *Coll Antropol*, 35, 7-10.

41. Damaskos, C., Garmpis, N., Valsami, S., Spartalis, E., Antoniou, E. A., Tomos, P., . . . Dimitroulis, D. (2016). Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Therapeutic Weapon Against Medullary Thyroid Cancer? *Anticancer Res*, 36(10), 5019-5024. doi: 10.21873/anticancer.11070
42. Das, C. K., Mandal, M., & Kogel, D. (2018). Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 37(4), 749-766. doi: 10.1007/s10555-018-9727-z
43. Dasgupta, A., Lim, A. R., & Ghajar, C. M. (2017). Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol Oncol*, 11(1), 40-61. doi: 10.1002/1878-0261.12022
44. Dawson, M. A., T. Kouzarides and B. J. Huntly (2012). "Targeting epigenetic readers in cancer." *N Engl J Med* 367(7): 647-657.
45. De Francesco, Ernestina M., Marcello Maggiolini, y Anna Maria Musti (2018). "Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in Breast Cancer EMT". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7): 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms19072011>.
46. de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp and A. B. van Kuilenburg (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." *Biochem J* 370(Pt 3): 737- 749.
47. De Souza, C. and B. P. Chatterji (2015). "HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics." *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 10(2): 145-162.
48. DeFilippis, R. A., Chang, H., Dumont, N., Rabban, J. T., Chen, Y. Y., Fontenay, G. V., . . . Tlsty, T. D. (2012). CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov*, 2(9), 826-839. doi: 10.1158/2159- 8290.CD-12-0107
49. Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun and S. A. Narod (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4429-4434.
50. Dogu, G. G., M. Ozkan, F. Ozturk, M. Dikilitas, O. Er and A. Ozturk (2010). "Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of survivin." *Med Oncol* 27(1): 34-39.
51. Dovey, O. M., C. T. Foster and S. M. Cowley (2010). "Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8242- 8247.
52. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179-183. doi: 10.1038/nature10137
53. Dupuy, F., Tabaries, S., Andrzejewski, S., Dong, Z., Blagih, J., Annis, M. G., . . . Siegel, P. M. (2015). PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab*, 22(4), 577-589. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.007
54. Egger, G., G. Liang, A. Aparicio and P. A. Jones (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* 429(6990): 457-463.
55. Eiro, N., Gonzalez, L., Martinez-Ordonez, A., Fernandez-Garcia, B., Gonzalez, L. O., Cid, S., . . .

Vizoso, F. J. (2018). Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cell Oncol (Dordr)*, 41(4), 369-378. doi: 10.1007/s13402-018-0371-y

56. Elston, C.W., y I.O. Ellis. 1991. "Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience from a Large Study with Long-Term Follow-Up". *Histopathology* 19 (5): 403–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>.

57. Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow and N. P. Pavletich (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* 401(6749): 188-193.

58. Fischle, W., F. Dequiedt, M. J. Hendzel, M. G. Guenther, M. A. Lazar, W. Voelter and E. Verdin (2002). "Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR." *Molecular Cell* 9(1): 45-57.

59. Foulkes, W. D., I. M. Stefansson, P. O. Chappuis, L. R. Begin, J. R. Goffin, N. Wong, M. Trudel and L. A. Akslen (2003). "Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 95(19): 1482-1485.

60. Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nature Genetics* 37(4): 391-400.

61. Friedman, Gil, Levi-Galibov, Oshrat, David, Eyal, Bornstein, Chamutal, Giladi, Amir, Dadiani, Maya, ... Scherz-Shouval, Ruth. (2020). Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nature Cancer*, 1(7), 692-708. doi: 10.1038/s43018-020-0082-y

62. Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1392-1400. doi: 10.1038/ncb1658

63. Galasinski, S. C., K. A. Resing, J. A. Goodrich and N. G. Ahn (2002). "Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions." *Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19618-19626.

64. Gascard, P., & Tlsty, T. D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev*, 30(9), 1002-1019. doi: 10.1101/gad.279737.116

65. Geutjes, E. J., P. K. Bajpe and R. Bernards (2012). "Targeting the epigenome for treatment of cancer." *Oncogene* 31(34): 3827-3844.

66. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021, 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

67. Glozak, M. A. and E. Seto (2007). "Histone deacetylases and cancer." *Oncogene* 26(37): 5420-

5432.

68. Gordon, N., Skinner, A. M., Pommier, R. F., Schillace, R. V., O'Neill, S., Peckham, J. L., . . . Pommier, S. J. (2015). Gene expression signatures of breast cancer stem and progenitor cells do not exhibit features of Warburg metabolism. *Stem Cell Res Ther*, 6, 157. doi: 10.1186/s13287-015-0153-7
69. Guo, Weichao, Bin Shan, Ross C. Klingsberg, Xiangmei Qin, y Joseph A. Lasky. 2009. "Abrogation of TGF-B1-Induced Fibroblast-Myofibroblast Differentiation by Histone Deacetylase Inhibition". *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (5): L864–70. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00128.2009>.
70. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
71. Hardisty, Jerry F., y Amy E. Brix. 2005. "Comparative Hepatic Toxicity: Prechronic/Chronic Liver Toxicity in Rodents". *Toxicologic Pathology* 33 (1): 35–40. <https://doi.org/10.1080/01926230590522077>.
72. Hassig, C. A., J. K. Tong, T. C. Fleischer, T. Owa, P. G. Grable, D. E. Ayer and S. L. Schreiber (1998). "A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3519-3524.
73. Heneberg, P. (2016). Paracrine tumor signaling induces transdifferentiation of surrounding fibroblasts. *Crit Rev Oncol Hematol*, 97, 303-311. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.09.008
74. Henke, E., Nandigama, R., & Ergun, S. (2019). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci*, 6, 160. doi: 10.3389/fmolb.2019.00160
75. Hodges-Gallagher, L., C. D. Valentine, S. E. Bader and P. J. Kushner (2007). "Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells and blocks tamoxifen-induced proliferation of uterine cells." *Breast Cancer Res Treat* 105(3): 297- 309.
76. Hsu, Li-Han, Nei-Min Chu, Yung-Feng Lin, y Shu-Huei Kao. 2019. "G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer". *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2): 306. <https://doi.org/10.3390/ijms20020306>.
77. Hu, Gaofeng, Li, Linzhang, & Xu, Wei. (2017). Extracellular matrix in mammary gland development and breast cancer progression. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(1), 36-39. doi: 10.1016/j.flm.2017.02.008
78. Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K. E., van den Brule, F., Velculescu, V., & Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, 37(8), 899-905. doi: 10.1038/ng1596
79. Hu, X., Li, D., Zhang, W., Zhou, J., Tang, B., & Li, L. (2012). Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Arch Gynecol Obstet*, 286(6), 1537-1543. doi: 10.1007/s00404-012-2456-6

80. Hyun-Jung, K. and B. Suk-Chul (2011). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs." *American Journal Of Translational Research* 3(2): 166-179.
81. Iacomino, G., M. C. Medici and G. L. Russo (2008). "Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis." *Anticancer Res* 28(2A): 855-864.
82. Imesch, Patrick, Eleftherios P. Samartzis, Konstantin J. Dedes, Daniel Fink, y André Fedier. 2013. "Histone Deacetylase Inhibitors Down-Regulate G-Protein-Coupled Estrogen Receptor and the GPER-Antagonist G-15 Inhibits Proliferation in Endometriotic Cells". *Fertility and Sterility* 100 (3): 770–76. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.008>.
83. Ireland, L., Santos, A., Campbell, F., Figueiredo, C., Hammond, D., Ellies, L. G., . . . Mielgo, A. (2018). Blockade of insulin-like growth factors increases efficacy of paclitaxel in metastatic breast cancer. *Oncogene*, 37(15), 2022-2036. doi: 10.1038/s41388-017-0115-x
84. Jansen, Maurice P.H.M., John A. Foekens, Iris L. van Staveren, et al. 2005. "Molecular Classification of Tamoxifen-Resistant Breast Carcinomas by Gene Expression Profiling". *Journal of Clinical Oncology* 23 (4): 732–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.145>.
85. Jena, B. C., Das, C. K., Bharadwaj, D., & Mandal, M. (2020). Cancer associated fibroblast mediated chemoresistance: A paradigm shift in understanding the mechanism of tumor progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1874(2), 188416. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188416
86. Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* 293(5532): 1074- 1080.
87. Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." *Nat Rev Drug Discov* 1(4): 287-299.
88. Jones, P. A. and R. Martienssen (2005). "A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop." *Cancer Research* 65(24): 11241-11246.
89. Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nature Reviews Genetics* 3(6): 415-428.
90. Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis and A. P. Wolffe (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet* 19(2): 187-191.
91. Jung, Y. Y., H. M. Kim and J. S. Koo (2016). "The role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer pathobiology." *Histol Histopathol* 31(4): 371-378.
92. Kabat, G. C., M. Kim, A. I. Phipps, C. I. Li, C. R. Messina, J. Wactawski-Wende, L. Kuller, M. S. Simon, S. Yasmeen, S. Wassertheil-Smoller and T. E. Rohan (2011). "Smoking and alcohol consumption in relation to risk of triple-negative breast cancer in a cohort of postmenopausal women." *Cancer Causes Control* 22(5): 775-783.
93. Kadel, D., Zhang, Y., Sun, H. R., Zhao, Y., Dong, Q. Z., & Qin, L. X. (2019). Current perspectives of cancer-associated fibroblast in therapeutic resistance: potential mechanism and future strategy. *Cell*

Biol Toxicol, 35(5), 407-421. doi: 10.1007/s10565-019-09461-z

94. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 16(9), 582-598. doi: 10.1038/nrc.2016.73

95. Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401. doi: 10.1038/nrc1877

96. Kamel, P. I., Qu, X., Geiszler, A. M., Nagrath, D., Harmancey, R., Taegtmeier, H., & Grande-Allen, K. J. (2014). Metabolic regulation of collagen gel contraction by porcine aortic valvular interstitial cells. *J R Soc Interface*, 11(101), 20140852. doi: 10.1098/rsif.2014.0852

97. Khan, N., M. Jeffers, S. Kumar, C. Hackett, F. Boldog, N. Khramtsov, X. Qian, E. Mills, S. C. Berghs, N. Carey, P. W. Finn, L. S. Collins, A. Tumber, J. W. Ritchie, P. B. Jensen, H. S. Lichenstein and M. Sehested (2008). "Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors." *Biochem J* 409(2): 581-589.

98. Kim, D. J., Dunleavy, J. M., Xiao, L., Ollila, D. W., Troester, M. A., Otey, C. A., . . . Dudley, A. C. (2018). Suppression of TGFbeta-mediated conversion of endothelial cells and fibroblasts into cancer associated (myo)fibroblasts via HDAC inhibition. *Br J Cancer*, 118(10), 1359-1368. doi: 10.1038/s41416-018-0072-3

99. Kim, G. D., Y. H. Choi, A. Dimtchev, S. J. Jeong, A. Dritschilo and M. Jung (1999). "Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase." *J Biol Chem* 274(44): 31127-31130.

100. Kim, Su-Nam, Nam Hyun Kim, Woojung Lee, Dong-Wan Seo, y Yong Kee Kim. 2009. "Histone Deacetylase Inhibitor Induction of P-Glycoprotein Transcription Requires Both Histone Deacetylase 1 Dissociation and Recruitment of CAAT/Enhancer Binding Protein β and pCAF to the Promoter Region". *Molecular Cancer Research* 7 (5): 735-44. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0296>.

101. Kim, Sung Hoon, Hye Yoon Lee, Seung Pil Jung, et al. 2014. "Role of Secreted Type I Collagen Derived from Stromal Cells in Two Breast Cancer Cell Lines". *Oncology Letters* 8 (2): 507-12. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2199>.

102. Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128(4): 693-705.

103. Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J. W., Carey, L., . . . Weinberg, R. A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(14), 4966-4971. doi: 10.1073/pnas.0401064101

104. Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P. H., Zhou, X. P., & Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet*, 32(3),

105. Lagger, S., D. Meunier, M. Mikula, R. Brunmeir, M. Schleder, M. Artaker, O. Pusch, G. Egger, A. Hagelkruys, W. Mikulits, G. Weitzer, E. W. Muellner, M. Susani, L. Kenner and C. Seiser (2010). "Crucial function of histone deacetylase 1 for differentiation of teratomas in mice and humans." *EMBO J* 29(23): 3992-4007.

106. Lagneaux, L., N. Gillet, B. Stamatopoulos, A. Delforge, M. Dejeneffe, M. Massy, N. Meuleman, A. Kentos, P. Martiat, L. Willerns and D. Bron (2007). "Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response." *Experimental Hematology* 35(10): 1527-1537.
107. Lara-Medina, F., V. Perez-Sanchez, D. Saavedra-Perez, M. Blake-Cerda, C. Arce, D. Motola-Kuba, C. Villarreal-Garza, A. M. Gonzalez-Angulo, E. Bargallo, J. L. Aguilar, A. Mohar and O. Arrieta (2011). "Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity." *Cancer* 117(16): 3658- 3669.
108. LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2018). A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech*, 11(4). doi: 10.1242/dmm.029447
109. LeBleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., . . . Kalluri, R. (2014). PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, 16(10), 992-1003, 1001- 1015. doi: 10.1038/ncb3039
110. Lee, J. H., Choy, M. L., Ngo, L., Foster, S. S., & Marks, P. A. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33), 14639-14644. doi: 10.1073/pnas.1008522107
111. Lee, Y. T., Tan, Y. J., Falasca, M., & Oon, C. E. (2020). Cancer-Associated Fibroblasts: Epigenetic Regulation and Therapeutic Intervention in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(10). doi: 10.3390/cancers12102949
112. Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891- 906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027
113. Li, Y., Wu, T., Zhang, B., Yao, Y., & Yin, G. (2012). Matrix metalloproteinase-9 is a prognostic marker for patients with cervical cancer. *Med Oncol*, 29(5), 3394-3399. doi: 10.1007/s12032- 012-0283-z
114. Liang, Tao, Fengli Wang, Reham M. Elhassan, et al. 2023. "Targeting Histone Deacetylases for Cancer Therapy: Trends and Challenges". *Acta Pharmaceutica Sinica B* 13 (6): 2425–63. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.02.007>.
115. Libby, E. N., Becker, P. S., Burwick, N., Green, D. J., Holmberg, L., & Bensinger, W. I. (2015). Panobinostat: a review of trial results and future prospects in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*, 8(1), 9-18. doi: 10.1586/17474086.2015.983065
116. Liu, T., Han, C., Wang, S., Fang, P., Ma, Z., Xu, L., & Yin, R. (2019). Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*, 12(1), 86. doi: 10.1186/s13045-019-0770-1
117. Löscher, W. *The discovery of valproate (1999).In: Löscher, W. (eds) Valproate. Milestones in Drug Therapy. Birkhäuser, Basel.* https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8759-5_1
118. Majidinia, M., & Yousefi, B. (2017). Breast tumor stroma: A driving force in the development of

resistance to therapies. *Chem Biol Drug Des*, 89(3), 309-318. doi: 10.1111/cbdd.12893

119. Mann, B. S., Johnson, J. R., He, K., Sridhara, R., Abraham, S., Booth, B. P., . . . Pazdur, R. (2007). Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 13(8), 2318-2322. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2672

120. Marks, P. A. (2007). "Discovery and development of SAHA as an anticancer agent." *Oncogene* 26(9): 1351-1356.

121. Márquez, M., J. C. Lacruz and L. F. Borges (2012). "Sobrevida en pacientes con cáncer de mama triple negativo." *Rev Obstet Ginecol Venez* 72(3): 152-160.

122. Martin, L. J., & Boyd, N. F. (2008). Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res*, 10(1), 201. doi: 10.1186/bcr1831

123. Martinez-Outschoorn, U. E., Goldberg, A., Lin, Z., Ko, Y. H., Flomenberg, N., Wang, C., . . . Lisanti, M. P. (2011). Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 12(10), 924-938. doi: 10.4161/cbt.12.10.17780

124. Martinez-Outschoorn, U. E., Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Daumer, K. M., Milliman, J. N., Chiavarina, B., . . . Sotgia, F. (2010). Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle*, 9(12), 2423-2433. doi: 10.4161/cc.9.12.12048

125. Massague, J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(10), 616-630. doi: 10.1038/nrm3434

126. Matossian, Margarite D., Hope E. Burks, Steven Elliott, et al. 2018. "Panobinostat Suppresses the Mesenchymal Phenotype in a Novel Claudin-Low Triple Negative Patient-Derived Breast Cancer Model". *Oncoscience* 5 (3-4): 99-108. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.412>.

127. Miller, K. M., J. V. Tjeertes, J. Coates, G. Legube, S. E. Polo, S. Britton and S. P. Jackson (2010). "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining." *Nat Struct Mol Biol* 17(9): 1144-1151.

128. Miller, T. A., D. J. Witter and S. Belvedere (2003). "Histone deacetylase inhibitors." *J Med Chem* 46(24): 5097-5116.

129. Minucci, S. and P. G. Pelicci (2006). "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer." *Nat Rev Cancer* 6(1): 38-51.

130. Minucci, S., C. Nervi, F. Lo Coco and P. G. Pelicci (2001). "Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?" *Oncogene* 20(24): 3110-3115.

131. Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2017). Neoplasias. In Elsevier Saunders (Ed.), *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional* (9th ed., pp. 266-340). Barcelona,

España.: Elsevier España, S.L.U.

132. Mitrus, I., E. Bryndza, A. Sochanik and S. Szala (2012). "Evolving models of tumor origin and progression." *Tumor Biol* 33(4): 911-917.
133. Mohamed, A., K. Krajewski, B. Cakar and C. X. Ma (2013). "Targeted therapy for breast cancer." *Am J Pathol* 183(4): 1096-1112.
134. Mongan, N. P. and L. J. Gudas (2005). "Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expression of silenced RARbeta2 in breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* 4(3): 477-486.
135. Morris, B. A., Burkel, B., Ponik, S. M., Fan, J., Condeelis, J. S., Aguirre-Ghiso, J. A., . . . Keely, P. J. (2016). Collagen Matrix Density Drives the Metabolic Shift in Breast Cancer Cells. *EBioMedicine*, 13, 146-156. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.012
136. National Comprehensive Cancer Network, N. (2018). "NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer." Retrieved april 17, 2018, 2018, from http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
137. Ng, Z. X., M. S. Ong, T. Jegadeesan, S. Deng and C. T. Yap (2017). "Breast Cancer: Exploring the Facts and Holistic Needs during and beyond Treatment." *Healthcare* 5(2).
138. Nguyen, A. H., Elliott, I. A., Wu, N., Matsumura, C., Vogelaer, M., Attar, N., . . . Donahue, T. R. (2017). Histone deacetylase inhibitors provoke a tumor supportive phenotype in pancreatic cancer associated fibroblasts. *Oncotarget*, 8(12), 19074-19088. doi: 10.18632/oncotarget.13572
139. Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., . . . Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *Journal of Cell Science*, 114(1), 111-118. doi: 10.1242/jcs.114.1.111
140. Oakman, C., G. Viale and A. Di Leo (2010). "Management of triple negative breast cancer." *Breast* 19(5): 312-321.
141. O'Connell, J. T., Sugimoto, H., Cooke, V. G., MacDonald, B. A., Mehta, A. I., LeBleu, V. S., . . . Kalluri, R. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(38), 16002-16007. doi: 10.1073/pnas.1109493108
142. Oiso, Hiroshi, Noboru Furukawa, Mihoshi Suefuji, et al. 2011. "The Role of Class I Histone Deacetylase (HDAC) on Gluconeogenesis in Liver". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 (1): 166–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.086>.
143. Olsen, C. M., E. T. Meussen-Elholm, L. S. Roste and E. Tauboll (2004). "Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7." *Mol Cell Endocrinol* 213(2): 173-179.
144. Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D., & Cunha, G. R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 59(19), 5002-5011. doi: 10.1186/bcr138

145. Ostman, A. (2014). Cancer-associated fibroblasts: recent developments and emerging challenges. *Semin Cancer Biol*, 25, 1-2. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.02.004
146. Patocs, A., Zhang, L., Xu, Y., Weber, F., Caldes, T., Mutter, G. L., . . . Eng, C. (2007). Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*, 357(25), 2543-2551. doi: 10.1056/NEJMoa071825
147. Pazolli, E., Alspach, E., Milczarek, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D., & Stewart, S. A. (2012). Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res*, 72(9), 2251-2261. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3386
148. Peart, M. J., G. K. Smyth, R. K. van Laar, D. D. Bowtell, V. M. Richon, P. A. Marks, A. J. Holloway and R. W. Johnstone (2005). "Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10): 3697- 3702.
149. Peng, Q., H. Luo and Y. Sun (2013). "Biological characteristics of carcinoma-associated fibroblasts in human breast cancer microenvironment." *Tumor Biol* 33: 855-861.
150. Peng, Q., Zhao, L., Hou, Y., Sun, Y., Wang, L., Luo, H., . . . Liu, M. (2013). Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer. *PLoS One*, 8(4), e60321. doi: 10.1371/journal.pone.0060321
151. Perou, C. M. (2010). "Molecular stratification of triple-negative breast cancers." *Oncologist* 15 Suppl 5: 39-48.
152. Phiel, C. J., F. Zhang, E. Y. Huang, M. G. Guenther, M. A. Lazar and P. S. Klein (2001). "Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen." *J Biol Chem* 276(39): 36734-36741.
153. Phillips, A., T. Bullock and N. Plant (2003). "Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line, FaO." *Toxicology* 192(2-3): 219-227.
154. Phipps, A. I., R. T. Chlebowski, R. Prentice, A. McTiernan, J. Wactawski-Wende, L. H. Kuller, L. L. Adams-Campbell, D. Lane, M. L. Stefanick, M. Vitolins, G. C. Kabat, T. E. Rohan and C. I. Li (2011). "Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 103(6): 470-477.
155. Pierobon, M. and C. L. Frankenfeld (2013). "Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis." *Breast Cancer Res Treat* 137(1): 307-314.
156. Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*, 5(1), e19. doi: 10.1371/journal.pmed.0050019
157. Polyak, K., & Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(11), a003244. doi: 10.1101/cshperspect.a003244
158. Prat, A., B. Adamo, M. C. Cheang, C. K. Anders, L. A. Carey and C. M. Perou (2013). "Molecular

characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer." *Oncologist* 18(2): 123-133.

159. Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. P. He and C. M. Perou (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." *Breast Cancer Research* 12(5).

160. Prestegui Martel, Berenice, Alma Delia Chávez-Blanco, Guadalupe Domínguez-Gómez, et al. (2024). "N-(2-Hydroxyphenyl)-2-Propylpentanamide (HO-AAVPA) Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells, Decreasing GPER Expression". *Molecules* 29 (15): 3509. <https://doi.org/10.3390/molecules29153509>.

161. Prestegui-Martel, B., J. A. Bermudez-Lugo, A. Chavez-Blanco, A. Duenas-Gonzalez, J. R. Garcia-Sanchez, O. A. Perez-Gonzalez, M. Padilla, II, M. J. Fragoso-Vazquez, J. E. Mendieta-Wejebe, A. M. Correa-Basurto, D. Mendez-Luna, J. Trujillo-Ferrara and J. Correa-Basurto (2016). "N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide, a valproic acid aryl derivative designed in silico with improved anti-proliferative activity in HeLa, rhabdomyosarcoma and breast cancer cells." *J Enzyme Inhib Med Chem* 31(sup3): 140-149.

162. Puri, S., & Hebrok, M. (2010). Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell*, 18(3), 342-356. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.005

163. Qiao, A., Gu, F., Guo, X., Zhang, X., & Fu, L. (2016). Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Front Med*, 10(1), 33-40. doi: 10.1007/s11684-016-0431-5

164. Qiu, X., X. Xiao, N. Li and Y. Li (2017). "Histone deacetylases inhibitors (HDACis) as novel therapeutic application in various clinical diseases." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 72: 60-72.

165. Ramírez-Farías, Cynthia, Daniel González-Blas, y Andrés Quintanar-Stephano. 2021. "El papel del microambiente tumoral y los fibroblastos asociados a cáncer en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama". *Revista de Senología y Patología Mamaria*, diciembre, 100371. <https://doi.org/10.1016/j.senol.2021.08.003>.

166. Richon, V. M. (2006). "Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor." *British Journal of Cancer* 95(S1): S2-S6.

167. Richon, V. M., S. Emiliani, E. Verdin, Y. Webb, R. Breslow, R. A. Rifkind and P. A. Marks (1998). "A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3003-3007.

168. Roman-Perez, E., Casbas-Hernandez, P., Pirone, J. R., Rein, J., Carey, L. A., Lubet, R. A., . . . Troester, M. A. (2012). Gene expression in extratumoral microenvironment predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 14(2), R51. doi: 10.1186/bcr3152

169. Ruocco, M. R., Avagliano, A., Granato, G., Imperato, V., Masone, S., Masullo, M., . . . Arcucci, A. (2018). Involvement of Breast Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Development, Therapy

Resistance and Evaluation of Potential Therapeutic Strategies. *Curr Med Chem*, 25(29), 3414- 3434. doi: 10.2174/0929867325666180309120746

170. Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., . . . Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 20(3), 174-186. doi: 10.1038/s41568-019-0238-1

171. Sánchez, N. C. (2013). "Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer." *Revista Médica Clínica Las Condes* 24(4): 553-562.

172. Sato, Katsuaki, Yoshimichi Ueda, Keiichi Ueno, Kazuya Okamoto, Hideaki Iizuka, y Shogo Katsuda. 2005. "Hepatocellular Carcinoma and Nonalcoholic Steatohepatitis Developing during Long-Term Administration of Valproic Acid". *Virchows Archiv* 447 (6): 996–99. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0042-z>.

173. Schuchmann, M., H. Schulze-Bergkamen, B. Fleischer, J. M. Schattenberg, J. Siebler, A. Weinmann, A. Teufel, M. Worns, T. Fischer, S. Strand, A. W. Lohse and P. R. Galle (2006). "Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy." *Oncol Rep* 15(1): 227-230.

174. Senese, S., K. Zaragoza, S. Minardi, I. Muradore, S. Ronzoni, A. Passafaro, L. Bernard, G. F. Draetta, M. Alcalay, C. Seiser and S. Chiocca (2007). "Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation." *Mol Cell Biol* 27(13): 4784-4795.

175. Senthane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Shipanga, H., Munro, D., Mazeedi, Mama, . . . Dzobo, K. (2017). The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi: 10.3390/ijms18071586

176. Sharma, S., T. K. Kelly and P. A. Jones (2010). "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* 31(1): 27-36.

177. Sixto-López, Yudibeth, José Antonio Gómez-Vidal, Nuria De Pedro, Martiniano Bello, Martha Cecilia Rosales-Hernández, y José Correa-Basurto. 2020. "Hydroxamic Acid Derivatives as HDAC1, HDAC6 and HDAC8 Inhibitors with Antiproliferative Activity in Cancer Cell Lines". *Scientific Reports* 10 (1): 10462. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67112-4>.

178. Sixto-López, Yudibeth, Martha Cecilia Rosales-Hernández, Arturo Contis-Montes De Oca, et al. 2020. "N-(2'-Hydroxyphenyl)-2-Propylpentanamide (HO-AAVPA) Inhibits HDAC1 and Increases the Translocation of HMGB1 Levels in Human Cervical Cancer Cells". *International Journal of Molecular Sciences* 21 (16): 5873. <https://doi.org/10.3390/ijms21165873>.

179. Stearns, V., Q. Zhou and N. E. Davidson (2007). "Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy." *Cancer Invest* 25(8): 659-665.

180. Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* 403(6765): 41-45.

181. Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C., Pinter, J., . . . Discher, D. E. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*,

341(6149), 1240104. doi: 10.1126/science.1240104

182. Tang, F. Y., Chiang, E. P., & Sun, Y. C. (2008). Resveratrol inhibits heregulin-beta1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells. *J Nutr Biochem*, 19(5), 287-294. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.03.003

183. Tang, J., H. Yan and S. Zhuang (2013). "Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases." *Clin Sci (Lond)* 124(11): 651-662.

184. Tang, Wei, Anthony G. Borel, Tatsuya Fujimiya, y Frank S. Abbott. 1995. "Fluorinated Analogs as Mechanistic Probes in Valproic Acid Hepatotoxicity: Hepatic Microvesicular Steatosis and Glutathione Status". *Chemical Research in Toxicology* 8 (5): 671–82. <https://doi.org/10.1021/tx00047a006>.

185. Tang, Z., S. Ding, H. Huang, P. Luo, B. Qing, S. Zhang and R. Tang (2017). "HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8." *Biol Chem* 398(12): 1347-1356.

186. Tavares-Valente, D., Baltazar, F., Moreira, R., & Queiros, O. (2013). Cancer cell bioenergetics and pH regulation influence breast cancer cell resistance to paclitaxel and doxorubicin. *J Bioenerg Biomembr*, 45(5), 467-475. doi: 10.1007/s10863-013-9519-7

187. Tlsty, T. D., & Coussens, L. M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*, 1, 119-150. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224

188. Ungerstedt, J. S., Y. Sowa, W. S. Xu, Y. Shao, M. Dokmanovic, G. Perez, L. Ngo, A. Holmgren, X. Jiang and P. A. Marks (2005). "Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 673-678.

189. Ursin, G., Hovanessian-Larsen, L., Parisky, Y. R., Pike, M. C., & Wu, A. H. (2005). Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. *Breast Cancer Res*, 7(5), R605-608. doi: 10.1186/bcr1260

190. Vallejos, C. S., H. L. Gomez, W. R. Cruz, J. A. Pinto, R. R. Dyer, R. Velarde, J. F. Suazo, S. P. Neciosup, M. Leon, M. A. de la Cruz and C. E. Vigil (2010). "Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database." *Clin Breast Cancer* 10(4): 294-300.

191. Van den Wyngaert, I., W. de Vries, A. Kremer, J. M. Neefs, P. Verhasselt, W. H. M. L. Luyten and S. U. Kass (2000). "Cloning and characterization of human histone deacetylase 8." *Febs Letters* 478(1-2): 77-83.

192. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809

193. Wade, P. A. (2001). "Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin." *Human Molecular Genetics* 10(7): 693- 698.

194. Walker, R. A. (2001). The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res*, 3(3), 143-

145. doi: 10.1186/bcr287

195. Wang, Hao, Cheng Huang, Liang Zhao, et al. 2016. "Histone Deacetylase Inhibitors Regulate P-Gp Expression in Colorectal Cancer via Transcriptional Activation and mRNA Stabilization". *Oncotarget* 7 (31): 49848–58. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10488>.

196. Wang, J., Xu, H., Wang, Q., Zhang, H., Lin, Y., Zhang, H., . . . Pang, T. (2015). CIAPIN1 targets Na(+)/H(+) exchanger 1 to mediate MDA-MB-231 cells' metastasis through regulation of MMPs via ERK1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res*, 333(1), 60-72. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.02.012

197. Wang, Z., C. Zang, J. A. Rosenfeld, D. E. Schones, A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, W. Peng, M. Q. Zhang and K. Zhao (2008). "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome." *Nat Genet* 40(7): 897-903.

198. Weichert, W. (2009). "HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies." *Cancer Lett* 280(2): 168-176.

199. Weisenberger, D. J., K. D Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile and P. W. Laird (2006). "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer." *Nature Genetics* 38(7): 787-793.

200. Weißenborn, Christine, Tanja Ignatov, Hans-Joachim Ochel, et al. 2014. "GPER Functions as a Tumor Suppressor in Triple-Negative Breast Cancer Cells". *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 140 (5): 713–23. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1620-8>.

201. Weitzel, J. N., K. R. Blazer, D. J. MacDonald, J. O. Culver and K. Offit (2011). "Genetics, Genomics, and Cancer Risk Assessment State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine." *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 61(5): 327-359.

202. West, A. C. and R. W. Johnstone (2014). "New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment." *J Clin Invest* 124(1): 30-39.

203. Wiseman, B. S., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, 296(5570), 1046-1049. doi: 10.1126/science.1067431

204. Woo, Y. M. (2016). Epigenetic Regulation in Cystogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 933, 59-68. doi: 10.1007/978-981-10-2041-4_6

205. Xie, J., Wu, H., Dai, C., Pan, Q., Ding, Z., Hu, D., . . . Hu, X. (2014). Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells. *Sci Rep*, 4, 4927. doi: 10.1038/srep04927

206. Xie, Xuefen, Hailing Liao, Huaixin Dang, et al. 2009. "Down-Regulation of Hepatic HNF4 α Gene Expression during Hyperinsulinemia via SREBPs". *Molecular Endocrinology* 23 (4): 434–43. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0531>.

207. Yan, W., S. Liu, E. Xu, J. Zhang, Y. Zhang, X. Chen and X. Chen (2013). "Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8." *Oncogene* 32(5): 599- 609.

208. Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., & Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J*, 31(1), 110-123. doi: 10.1038/emboj.2011.364
209. Yang, I. V. and D. A. Schwartz (2011). "Epigenetic control of gene expression in the lung." *Am J Respir Crit Care Med* 183(10): 1295-1301.
210. Yu, T., Yang, G., Hou, Y., Tang, X., Wu, C., Wu, X. A., . . . Liu, M. (2017). Cytoplasmic GPER translocation in cancer-associated fibroblasts mediates cAMP/PKA/CREB/glycolytic axis to confer tumor cells with multidrug resistance. *Oncogene*, 36(15), 2131-2145. doi: 10.1038/onc.2016.370
211. Zaharia, M. and H. Gomez (2013). "Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 30(4): 649-656.
212. Zhang, H., Y. P. Shang, H. Y. Chen and J. Li (2017). "Histone deacetylases function as novel potential therapeutic targets for cancer." *Hepatol Res* 47(2): 149-159.
213. Zhang, K., Corsa, C. A., Ponik, S. M., Prior, J. L., Piwnica-Worms, D., Eliceiri, K. W., . . . Longmore, G. D. (2013). The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 15(6), 677-687. doi: 10.1038/ncb2743
214. Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, Y. Hara, S. Kobayashi and H. Iwase (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*." *Breast Cancer Res Treat* 94(1): 11-16.
215. Zhao, Q., G. Rank, Y. T. Tan, H. T. Li, R. L. Moritz, R. J. Simpson, L. Cerruti, D. J. Curtis, D. J. Patel, Zhao, X. L., Lin, Y., Jiang, J., Tang, Z., Yang, S., Lu, L., . . . Yao, X. H. (2017). High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. *J Pathol*, 243(3), 376-389. doi: 10.1002/path.4958
216. Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y. T., Li, H., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Cerruti, L., Curtis, D. J., Patel, D. J., Allis, C. D., Cunningham, J. M., & Jane, S. M. (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3), 304–311. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1568>
217. Ziauddin, M. F., W. S. Yeow, J. B. Maxhimer, A. Baras, A. Chua, R. M. Reddy, W. Tsai, G. W. Cole, D. S. Schrump and D. M. Nguyen (2006). "Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of Apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation." *Neoplasia* 8(6): 446-457.
218. Xu T, Ma D, Chen S, Tang R, Yang J, Meng C, et al. (2022). High GPER expression in triple-negative breast cancer is linked to pro-metastatic pathways and predicts poor patient outcomes. *Npj Breast Cancer*. 8(1):100.