

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS  
GÉNICA EN UN MODELO *IN VITRO* DE CÁNCER DE MAMA EXPUESTO A DAÑO  
GENOTÓXICO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en  
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de  
Maestría Académica en Microbiología

KATHERINE MARÍA HIDALGO RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2025

## **DEDICATORIA**

A los amores de mi vida:

Olga, mi mamá

Walter, mi esposo

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecerle a Dios porque me ha enseñado que su amor es más cercano de lo que he creído, porque ha estado presente en lo más cotidiano y porque se interesa en lo que me intereso.

Quiero agradecerle a mi mamá, Olga, porque ha sido mi mayor soporte en la vida y no sería quién soy si no fuera por ella, porque me ha dado todo su amor y más. Porque todo lo que haga siempre será gracias a ella. Porque siempre cree en mí.

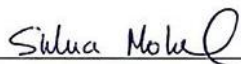
Quiero agradecerle a mi amor elegido, Walter, por ser mi mayor fan, por siempre motivarme a esforzarme un poco más, porque cree en mí, más de lo que yo misma creo, porque su amor me permite amarme.

Quiero agradecerle a mi tutor, Steve, porque siempre tuvo el tiempo para conversar en el pasillo, siempre tuvo una palabra de aliento cuando las cosas parecían no salir y porque enseña desde la empatía y no solo el conocimiento.

Quiero agradecerle a la Universidad de Costa Rica y el Estado Social de Derecho, porque mi educación superior se la debo completamente a la solidaridad civil de los y las costarricenses.

Por último y no menos importante, quiero agradecerme por no rendirme y por seguir intentando.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.



PhD. Silvia Molina Castro

**Representante de la Decana**

**Sistema de Estudios de Posgrado**



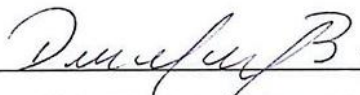
PhD. Steve Quirós Barrantes

**Director de Tesis**



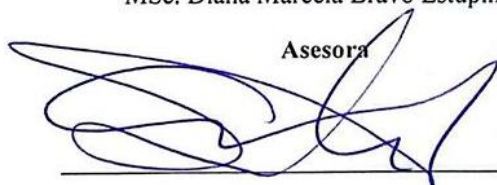
PhD. Rodrigo Mora Rodríguez

**Asesor**



MSc. Diana Marcela Bravo Estupiñan

**Asesora**



PhD. Carlos Santamaría Quesada

**Representante**

**Programa de Posgrado en Microbiología**



Katherine María Hidalgo Rodríguez

**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTO .....	III
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
<b>CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1    CONTEXTUALIZACIÓN DEL CÁNCER .....	1
1.2    DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER .....	3
1.3    INESTABILIDAD GENÓMICA .....	4
1.4    INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÉLULAS DE CÁNCER.....	6
1.5    PARADOJA DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÉLULAS DE CÁNCER .....	8
1.6    ANTE LA PARADOJA: HIPÓTESIS DE LA COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA .....	10
1.7    EL DAÑO GENOTÓXICO COMO INDUCTOR DE INESTABILIDAD GENÓMICA.....	14
1.8    CISPLATINO Y EL DAÑO GENOTÓXICO.....	16
1.9    ETOPÓSIDO Y EL DAÑO GENOTÓXICO .....	20
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1    HIPÓTESIS .....	27
3.2    OBJETIVO GENERAL.....	27
3.3    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1    MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA.....	28
4.2    SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA Y EXOMA COMPLETO .....	36
4.3    ANÁLISIS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA .....	43
4.4    PERFIL FUNCIONAL .....	45
4.5    INFRAESTRUCTURA Y EQUIPO .....	46
4.6    COLABORACIONES .....	47
4.7    FUENTES DE FINANCIAMIENTO.....	47
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1.    EVALUACIÓN DEL MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA .....	48
5.2.    LISTA DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA.....	60
5.3.    PERFIL FUNCIONAL.....	64
<b>CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO 1.</b> LISTA DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO 6 $\mu$ M.....	110
<b>ANEXO 2.</b> LISTA DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO 8 $\mu$ M.....	114
<b>ANEXO 3.</b> LISTA DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON ETOPÓSIDO 4 $\mu$ M.....	118
<b>ANEXO 4.</b> LISTA DE GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON ETOPÓSIDO 6 $\mu$ M.....	122
<b>ANEXO 5.</b> LISTA DE GENES, EN COMÚN, CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO.....	125
<b>ANEXO 6.</b> LISTA DE GENES, EN COMÚN, CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON ETOPÓSIDO.....	127
<b>ANEXO 7.</b> LISTA DE GENES, EN COMÚN, CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO Y ETOPÓSIDO. ....	129
<b>ANEXO 8.</b> LISTA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (TFs) Y MICROARNs (MIRs) IDENTIFICADOS EN LA LISTA DE GENES, EN COMÚN, CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO.....	130
<b>ANEXO 9.</b> LISTA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (TFs) Y MICROARNs (MIRs) IDENTIFICADOS, EN LA LISTA DE GENES, EN COMÚN, CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON ETOPÓSIDO.....	140

## RESUMEN

La inestabilidad genómica un fenómeno ampliamente distribuido en las células de cáncer, más del 90% de los tumores sólidos y un 75% de tumores hematopoyéticos se asocian a aneuploidía. En células sanas la inestabilidad del ADN tiene propiedades antitumorales, que induce muerte celular, pero en algunas condiciones, puede adquirir propiedades protumorales. El aumento de la inestabilidad genómica en cáncer se asocia con peores pronósticos clínicos, mayor quimioresistencia y mayor potencial para el desarrollo de metástasis. Se ha hipotetizado que la compensación de dosis génica podría explicar esta paradoja. La presente tesis de investigación propone que ante daño genotóxico las células de cáncer de mama inducen el fenómeno de compensación de dosis génica que contribuye al proceso de proliferación celular. Para esto se propuso un modelo de inestabilidad genómica acelerada en la línea celular HS-578T de cáncer de mama, en el cual se realizó un tratamiento con distintas dosis de cisplatino y etopósido y se evaluó la heterogeneidad celular inducida por los tratamientos. Para esto se evaluaron los cambios a nivel del ciclo celular, un índice de heterogeneidad normalizado y las anomalías estructurales del cariotipo celular. El índice de heterogeneidad se calculó a partir de los datos de fluorescencia de una doble tinción de ADN y los parámetros de forward y side scatter; se seleccionó la población G1 y mediante un modelo de mezclas gaussianas se agruparon las subpoblaciones celulares identificadas en G1, en estas cuatro dimensiones. Los resultados en conjunto permitieron identificar que el modelo fue capaz de inducir un aumento en el número de subpoblaciones celulares e inducir un aumento en la complejidad de las alteraciones estructurales del cariotipo. Se seleccionaron las dosis de cisplatino 6 y 8  $\mu\text{M}$  y de etopósido 4 y 6  $\mu\text{M}$  debido a que fueron capaces de inducir inestabilidad genómica y para las que previamente se ha demostrado que permiten la sobrevivencia y proliferación de las células de cáncer. Para las dosis seleccionadas en el modelo, se realizó la secuenciación del transcriptoma y exoma completo, con el objetivo de identificar una lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el modelo de inestabilidad genómica acelerada. Se realizó un análisis de expresión diferencial con DESeq2 y un análisis de inferencia del número de copias con CNVkit. El análisis de compensación de dosis génica se realizó a partir del análisis de expresión diferencial, donde se seleccionaron los genes con un  $p > 0.05$ , en los que no hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión respecto al control sin tratamiento, y a partir de la inferencia del número de copias, a partir del cual se seleccionaron los exones con un  $\log_2$  ratio mayor a cero, que corresponde a los exones en los que aumentó el número de copias respecto al control sin tratamiento. Se seleccionaron los genes en los que el 100% de los exones que lo componen tuvieron un aumento en el número de copias. Se identificó una lista de genes candidatos de compensación de dosis génica, en los que hubo un aumento en el número de copias de todos sus exones, sin un cambio estadísticamente significativo en la expresión. Se realizó un perfil funcional de los genes identificados mediante KEGG, las vías funcionalmente enriquecidas en la lista fueron *Hippo*, *Wnt* y *PPAR*. Se realizó un análisis en BioNet UCR para identificar los factores de transcripción y las redes de regulación de estos genes, donde se identificó *GRHL2*, *NR3C1*, *GATA3*, *MYB*, *MYC* y *PPAR*. A partir de la lista de genes identificada en la presente tesis se podrían realizar estudios de validación para confirmar la compensación, identificar los mecanismos y el efecto en progresión tumoral.

## ABSTRACT

Genomic instability is a widely observed phenomenon in cancer cells, with over 90% of solid tumors and 75% of hematopoietic tumors being associated with aneuploidy. In normal cells, DNA instability has antitumoral properties that induces cell death. However, under certain conditions, it can acquire protumoral properties. An increase in the genomic instability of cancer is associated with worse clinical outcomes, chemoresistance and metastasis. It has been hypothesized that gene dosage compensation may explain this paradox. This thesis proposes that in response to genotoxic damage, breast cancer cells induce gene dosage compensation, which contributes to the cellular proliferation process. To achieve this, we established an accelerated genomic instability model in a HS-578T breast cancer cell line, where cells were treated with a range of cisplatin and etoposide doses. Cellular heterogeneity induced by the model was evaluated at cell cycle phases quantification, a normalize heterogeneity and cellular karyotype. The heterogeneity index was calculated based on fluorescence data from a double DNA staining and forward and side scatter parameters. The G1 population was selected, and using a Gaussian mixture model, the identified subpopulations within G1 were grouped across four dimensions. We identified that the model successfully induced an increase in the number of subpopulations or cellular heterogeneity and an increase in the complexity of structural alterations in the karyotype. Cisplatin doses of 6 and 8  $\mu\text{M}$  and etoposide doses of 4 and 6  $\mu\text{M}$  were chosen because they induced genomic instability and supported cell survival and proliferation, as demonstrated in a previous study. For the selected doses, RNA-sequencing and Exome-sequencing were performed to identify a list of candidate genes for gene dosage compensation induced by the accelerated genomic instability model. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 and copy number inference was performed with CNVkit. Gene dosage compensation analysis was carried out from the differential expression analysis, genes with a p-value  $> 0.05$  were selected, genes statistically non-significant compared to the untreated control. The copy number inference, exons with a log<sub>2</sub> ratio greater than zero, corresponding to exons where copy number increased compared to the control, were selected. Genes where 100% of their exons exhibited an increase in copy number were identified. A list of candidate genes for gene dosage compensation was generated, showing an increase in copy number for all their exons without a statistically significant change in expression. A functional profile of the identified genes was performed using KEGG, revealing that the enriched functional pathways were *Hippo*, *Wnt*, and *PPAR* signaling pathways. An analysis in BioNet UCR was also performed to identify the transcription factors and regulatory networks of these genes, identifying *GRHL2*, *NR3C1*, *GATA3*, *MYB*, *MYC*, and *PPAR*. The list of genes identified in this thesis is a preliminary analysis in vitro to identify genes that could be under gene dosage compensation. Posterior projects could be set as a validation method to confirm gene dosage compensation, identify the underlying mechanisms, and assess their effect on tumor progression.

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA GUÍA UTILIZADA PARA LA CLASIFICACIÓN DE LAS ANORMALIDADES ESTRUCTURALES DEL CARIOTIPO CELULAR. ADAPTADO DE SAVAGE (1975, 1999).....	35
---	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO IN VITRO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA..	28
FIGURA 2. PROTOCOLO DE ANÁLISIS PARA EL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN DE ARN.	37
FIGURA 3. PROTOCOLO DE ANÁLISIS PARA EL PROCESAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN DEL EXOMA COMPLETO.	41
FIGURA 4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN GÉNICA Y SU PERFIL FUNCIONAL.	44
FIGURA 5. CAMBIOS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON CPT EN LAS CÉLULAS HS-578T DE CÁNCER DE MAMA.	49
FIGURA 6. CAMBIOS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON ETO EN LAS CÉLULAS HS-578T DE CÁNCER DE MAMA.	50
FIGURA 7. CAMBIOS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA, HS-578T INDUCIDOS POR TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA GENOTÓXICA.	51
FIGURA 8. ESTIMACIÓN DE LA HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN CELULAR POST TRATAMIENTO MEDIANTE EL ÍNDICE DE HETEROGENEIDAD NORMALIZADO.	53
FIGURA 9. DOSIS CRECIENTES DE QUIMIOTERAPIA GENOTÓXICA INDUCEN CAMBIOS EN LA HETEROGENEIDAD, EN CÉLULAS HS-578T, EVALUADOS MEDIANTE IHN.	54
FIGURA 10. DOSIS CRECIENTES DE QUIMIOTERAPIA GENOTÓXICA INDUCEN ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LOS CROMOSOMAS DE LA LÍNEA CELULAR HS-578T.	56
FIGURA 11. EL TRATAMIENTO CON DOSIS CRECIENTES DE CPT Y ETO INDUCEN UNA DISMINUCIÓN EN LA CANTIDAD CROMOSOMAS NORMALES Y UN AUMENTO EN LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES.	57
FIGURA 12. EL TRATAMIENTO CON DOSIS DE 16 mM DE CISPLATINO Y ETOPÓSIDO INDUCE LOS FENÓMENOS DE PEGAJOSIDAD Y PULVERIZACIÓN EN LOS CROMOSOMAS CELULARES.	59
FIGURA 13. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL Y LA VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (CNV) A PARTIR DE LA SECUENCIACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA Y EXOMA COMPLETO.	61
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE EXONES AMPLIFICADOS POR GEN EN CADA CONDICIÓN GENOTÓXICA.	63
FIGURA 15. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS VÍAS METABÓLICAS, EN TÉRMINOS KEGG, ASOCIADOS A GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA EN UN MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA CON CPT.	66
FIGURA 16. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS VÍAS METABÓLICAS, EN TÉRMINOS KEGG, ASOCIADOS A GENES CANDIDATOS DE COMPENSACIÓN DE DOSIS GÉNICA EN UN MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA CON ETO.	67
FIGURA 17. REDES DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN UN MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA CON CPT.	69
FIGURA 18. REDES DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN UN MODELO DE INESTABILIDAD GENÓMICA ACELERADA CON ETO.	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo</b>
<b>ABCG2</b>	ATP binding cassette subfamily G member 2
<b>Apo</b>	Apolipoproteína
<b>Anti-Anti</b>	Antibiótico-antimicótico de penicilina, estreptomicina y anfotericina B
<b>BCSCs</b>	Células madre del cáncer de mama
<b>CIN</b>	Inestabilidad cromosómica
<b>CNT00</b>	Control sin tratamiento
<b>CNV</b>	Variaciones en el número de copias
<b>CPT</b>	Cisplatino
<b>CPT06</b>	Cisplatino 6 $\mu$ M
<b>CPT08</b>	Cisplatino 8 $\mu$ M
<b>DRAGEN</b>	Dynamic Read Analysis for GENomics
<b>ETO</b>	Etopósido
<b>ETO04</b>	Etopósido 4 $\mu$ M
<b>ETO06</b>	Etopósido 6 $\mu$ M
<b>EsR</b>	Receptor de estrógenos
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>GATA3</b>	GATA binding protein 3
<b>GlutaMAX</b>	L-alanil-L-glutamina
<b>GRHL2</b>	Grainyhead like transcription factor 2
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HR</b>	Recombinación homóloga
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

<b>IHn</b>	Índice de Heterogeneidad normalizado
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>MDR1</b>	Multidrug resistance protein 1
<b>MIN</b>	Inestabilidad de microsatélites
<b>MIRs</b>	MicroARNs
<b>MMR</b>	Vía de reparación de pareos erróneos o Mismatch repair
<b>MYB</b>	MYB proto-oncogene, factor de transcripción
<b>MYC</b>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
<b>NER</b>	Vía de escisión de nucleótidos
<b>NR3C1</b>	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfatos
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator activated receptor
<b>RPMI 1640</b>	Roswell Park Memorial Institute sin rojo fenol
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SSC</b>	Side scatter
<b>TERT</b>	Telomerase reverse transcriptase
<b>TOPO</b>	ADN topoisomerasas
<b>TOPO I</b>	ADN topoisomerasas de una sola cadena

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1. 1 Contextualización del cáncer

Se ha dicho que el cáncer es tan antiguo como la raza humana, pero la realidad es que es aún más antiguo que la aparición de los seres humanos en la tierra, ya que hallazgos paleopatológicos han indicado que los tumores existían en animales desde tiempos prehistóricos (Lukong, 2017). Desde hace muchos años, el cáncer ha afectado a millones de personas en el mundo, la primera descripción conocida de un caso de cáncer se encuentra en el papiro de Edwin Smith, escrito en el año 3000 a.C. (Hajdu, 2011).

A pesar de la antigüedad del cáncer sigue afectando a muchas personas a nivel mundial. Las últimas estimaciones de GLOBOCAN, producidas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y difundidas como Cancer Today en el Observatorio Mundial de Cáncer, estimaron que en el 2022 se dieron cerca de 20 millones de casos nuevos y aproximadamente 9.7 millones de muertes por cáncer. Esto significa que aproximadamente 1 de cada 5 hombres o mujeres desarrollarán cáncer a lo largo de su vida y cerca de 1 de cada 9 fallecerán por esta causa (Bray et al., 2024). Además, 2/3 de estas muertes ocurrieron en países de bajos y medianos ingresos, donde el cáncer es comúnmente diagnosticado en etapas tardías y el acceso al tratamiento es limitado (Sung et al., 2021).

El cáncer de pulmón fue el cáncer más comúnmente diagnosticado para 2022, con una incidencia global estimada de 2.5 millones de casos nuevos (12.4%), seguido por el cáncer de mama (11.6), colorrectal (9.6%), próstata (7.3%) y estómago (4.9%). La principal causa de muerte por cáncer en el mundo, para el 2022, fue el cáncer de pulmón con aproximadamente 1.8 millones de muertes, seguido del cáncer colorrectal, de hígado, de mama y de estómago (Bray et al., 2024).

Se espera que la carga mundial anual de cáncer aumente a más de 28 millones de casos para 2040, lo que representa un aumento del 47% con respecto al 2020 (Sung et al., 2021). Sin embargo, más recientemente y con base en los cambios proyectados en el crecimiento y envejecimiento de la población, suponiendo que las tasas generales de cáncer permanezcan sin cambios, se predice que en el año 2050 se producirán más de 35 millones de casos nuevos de cáncer, un aumento del 77% con respecto a los 28 millones estimados en el 2022 (Bray et al., 2024; Sung et al., 2021). Estas estadísticas desalentadoras han llamado la atención en todo el mundo, para enfocar esfuerzos y reducir la mortalidad por cáncer en un tercio durante la próxima década (Jassim et al., 2023; WHO, 2020).

Se estima que para 2040, 67% de los casos anuales de cáncer sean en países de bajos y medianos ingresos (WHO, 2020). Pero aún en países desarrollados, más de 1/3 de los pacientes diagnosticados con cáncer se presentan como un caso de emergencia, con un estado relativamente tardío de la enfermedad y un riesgo significativamente aumentado de morir dentro de los primeros 12 meses (Jassim et al., 2023; McPhail et al., 2022).

En el caso de Costa Rica, para el 2022 se diagnosticaron aproximadamente 13 mil casos nuevos de cáncer y ocurrieron aproximadamente 6 mil muertes por cáncer. El cáncer más común, entre hombres y mujeres, es el cáncer de próstata con 1796 casos, seguido por el cáncer de mama, estómago, colorrectal y tiroides. En mujeres el cáncer más común es el cáncer de mama con 1300 casos y en hombres el cáncer de próstata con 1796 casos (Ferlay et al., 2024). La tasa de incidencia en el 2020 fue de 257.9 por 100 mil habitantes, con un aumento de 17.5% respecto a la tasa de incidencia del 2014 (Picado et al., 2018; Sung et al., 2021).

La principal causa de muerte en Costa Rica por cáncer, en el 2022, fue el cáncer de estómago con 774 muertes, seguido por el cáncer colorrectal (709), de próstata (487) y de mama (423) (Ferlay et al., 2024).

## 1. 2 Definición y características distintivas del cáncer

El Instituto Nacional de Cáncer, de los Estados Unidos, definió el cáncer como “una enfermedad en la cual algunas de las células del cuerpo crecen de forma descontrolada y se esparcen a otras partes del cuerpo” (National Cancer Institute, 2011). Otras instituciones como Mayo Clinic definen el cáncer como “cualquiera de una gran cantidad de enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales que se dividen sin control y tienen capacidad de infiltrarse y destruir el tejido corporal normal” (Mayo Clinic Staff, 2022). Y algunos autores definen el cáncer como “un grupo de enfermedades que constituyen más de 100 condiciones genéticamente diversas, que comparten varios puntos en común en los mecanismos moleculares y alteraciones metabólicas entre sí” (Upadhyay, 2021).

Desde el 2000 Hanahan y Weinberg publicaron las *características distintivas* de la conceptualización del cáncer o también conocidas con el anglicismo de *hallmarks del cáncer*, estas se han actualizado con el tiempo hasta la más reciente versión del 2022 (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011, 2000).

Según los autores la conceptualización de las características distintivas del cáncer “son una herramienta heurística para sintetizar la vasta complejidad de los fenotipos y genotipos del cáncer” (Hanahan, 2022). Y se propusieron como un conjunto de capacidades funcionales adquiridas por células normales que les permiten convertirse en células cancerosas, capaces de sobrevivir, proliferar y diseminar de forma descontrolada. Estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumores a través de diferentes mecanismos y en diferentes momentos durante el curso de la tumorigénesis. La adquisición de las características distintivas del cáncer es posible gracias a las *características habilitadoras* (Hanahan & Weinberg, 2011).

En el 2011 se publicaron las 2 primeras características “habilitadoras” del cáncer: inflamación promotora de tumores e inestabilidad genómica y mutación (Hanahan &

Weinberg, 2011). En el 2022, se agregaron 2 características habilitadoras más: reprogramación epigenética no-mutacional y microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022).

### **1. 3 Inestabilidad genómica**

El concepto de inestabilidad genómica hace referencia a una serie de cambios genéticos que ocurren a un ritmo acelerado en poblaciones de células derivadas del mismo precursor ancestral. También se puede utilizar como un término general para describir procesos que aumentan la tasa de mutación normal de las células, permitiendo así que las células puedan desarrollar fenotipos nuevos y agresivos, capaces de adaptarse a las presiones selectivas cambiantes, que podría culminar en la formación de un cáncer (Bayani et al., 2007).

Generalmente, la inestabilidad genómica se clasifica en dos tipos: inestabilidad de microsatélites (MIN) e inestabilidad cromosómica (CIN) (Bayani et al., 2007; Killcoyne et al., 2021). La MIN implica cambios simples en las bases del ADN, que ocurren debido a defectos en los sistemas de reparación del ADN (Bayani et al., 2007; Kolodner, 1995). Por otro lado, la CIN describe la tasa excesiva de cambios numéricos (CIN numérica) y/o estructurales (CIN estructural) en los cromosomas celulares, que ocurre producto de errores durante la segregación mitótica, lo que lleva a la formación de cariotipos anormales (Bayani et al., 2007; Killcoyne et al., 2021; Vargas-Rondón et al., 2018).

La CIN numérica resulta del fallo mitótico que lleva a la distribución anormal de las cromátides hermanas en las células hijas, por lo que hay un aumento o una disminución en el número de cromosomas en una célula (Killcoyne et al., 2021; Vargas-Rondón et al., 2018). Se puede manifestar como aneuploidía, que puede ser trisomía (la ganancia de 1 cromosoma) o monosomía (la pérdida de 1 cromosoma) y poliploidía, cuando el conjunto completo de cromosomas cambia, por ejemplo, se pasa de un organismo diploide ( $2n$ ) a uno triploide ( $3n$ ) (Vargas-Rondón et al., 2018).

Por otro lado, la CIN estructural describe las alteraciones en la morfología normal del cromosoma, con duplicaciones o pérdidas del material genético, el cual puede ir desde pocos nucleótidos hasta el brazo de un cromosoma completo, este último se conoce como alteración en el número de copias (CNA) y es la forma más común de variación estructural en el genoma del cáncer (Killcoyne et al., 2021). Así mismo, se pueden presentar otras estructuras anormales como cromosomas en anillo, dicéntricos, tricéntricos u otras aberraciones más complejas que pueden incluir más de un cromosoma (Killcoyne et al., 2021; Savage, 1975; Vargas-Rondón et al., 2018).

La poliploidía es un evento bastante común en plantas, peces y salamandras, pero raro en mamíferos, excepto en ciertos tipos de células altamente especializadas como las células del corazón, de médula ósea y del hígado (Comai, 2005; S. Zhang et al., 2018).

En todas las especies de mamíferos se pueden encontrar hepatocitos poliploides mononucleados y binucleados ( $4n$ ,  $8n$ ,  $16n$  y superiores) (Comai, 2005; Duncan et al., 2010; S. Zhang et al., 2018). La aneuploidía en el hígado es generalizada y afecta a un 60-70% de los hepatocitos en ratones y de un 25-50% de los hepatocitos en humanos (Duncan, 2013; Duncan et al., 2010, 2012). También se ha concluido que la aneuploidía hepática es independiente de la edad y el sexo del paciente, y se caracterizó en tejido hepático sin evidencia de transformación maligna (Duncan et al., 2012). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual los hepatocitos diploides se convierten en células poliploides es una citocinesis fallida (Duncan, 2013).

La evidencia demuestra que la aneuploidía hepática aleatoria puede promover la adaptación a la lesión hepática, por ejemplo, en respuesta al daño hepático crónico. Los subconjuntos de hepatocitos aneuploides que son diferencialmente resistentes a la lesión permanecen sanos, regeneran el hígado y restauran su función (Duncan et al., 2012). Por lo tanto, la aneuploidía y poliploidía en hepatocitos parecen ser un mecanismo evolutivo para

generar diversidad genética y permitir la adaptación de los hepatocitos al daño xenobiótico o nutricional, ya que posiblemente confieren una ventaja selectiva en condiciones de estrés (Duncan et al., 2010).

Sin embargo, la aneuploidía no es bien tolerada por los organismos eucariotas y de hecho es la causa más común de aborto espontáneo y trastornos del desarrollo intelectual en seres humanos. Todas las monosomías humanas y 20 de las 23 trisomías autosómicas son letales a nivel embrionario. De las 3 trisomías viables al nacer (13 o Síndrome de Patau, 18 o Síndrome Edwards y 21 o Síndrome de Down), solo la trisomía 21 puede sobrevivir hasta la edad adulta (Kojima & Cimini, 2019; Pai et al., 2002; J. Sheltzer & Amon, 2011).

Se puede resaltar que las monosomías (con excepción de la monosomía del cromosoma X, responsable del síndrome de Turner) en general no son observadas en seres humanos y también son muy raras en abortos, posiblemente porque esta condición no es compatible con la sobrevivencia de la célula o la implantación del óvulo fertilizado (Kojima & Cimini, 2019).

De manera semejante en ratones, todas las aneuploidías autosómicas son letales para el embrión, excepto trisomía 10, aunque muere poco después del nacimiento (J. Sheltzer & Amon, 2011). También se ha asociado con defectos en el desarrollo y letalidad en otros organismos como levaduras (Pavelka et al., 2010; J. Sheltzer & Amon, 2011). Evolutivamente parece ser que la aneuploidía representa una barrera considerable para el desarrollo exitoso de los organismos, aunque en ciertas células altamente especializadas y bajo ciertas condiciones específicas, la aneuploidía podría ser un mecanismo de adaptación y sobrevivencia (J. Sheltzer & Amon, 2011).

#### **1. 4 Inestabilidad genómica en células de cáncer**

Desde finales de siglo XIX, David von Hansemann y Theodor Boveri observaron que las divisiones celulares desiguales, se asocian con defectos en el desarrollo y cáncer (Hardy & Zacharias, 2005). Por lo que, desde hace más de 100 años se conoce que la aneuploidía es

un fenómeno ampliamente distribuido en las células de cáncer (Girish et al., 2023). Más del 90% de los tumores sólidos y cerca del 75% de los cánceres hematopoyéticos han ganado o perdido cromosomas completos (Weaver & Cleveland, 2006).

Se ha estimado que cerca del 25% de los cánceres exhiben una ganancia en el brazo q del cromosoma 1 y en general el 97% de los cánceres de mama exhiben 1 o más aneuploidías. Además, algunos tipos de cáncer exhiben patrones de aneuploidía específicos, que son observados con mayor frecuencia. Por ejemplo, en cáncer de mama el 60% poseen una trisomía en el cromosoma 1q, haciendo esta alteración más común que mutaciones en *PIK3CA*, *TP53* o cualquier otro gen individual; en la mayoría de los glioblastomas hay una ganancia de una copia extra del cromosoma 7 y una pérdida del cromosoma 10 (Girish et al., 2023; Vasudevan et al., 2021).

Las anomalías en el ADN es uno de los elementos que comparten las diferentes teorías del origen del cáncer. Se ha reconocido, desde hace tiempo, que cambios en la secuencia de ADN son elementos fundamentales para la transformación celular, ya que pueden activar la función de oncogenes (por ejemplo, mutaciones puntuales, amplificaciones y translocaciones) o inactivar genes supresores de tumores (por ejemplo, mutaciones sin sentido o deleciones) (Jassim et al., 2023).

De hecho, se planteó que la característica habilitadora más destacada en el desarrollo de un cáncer es la inestabilidad genómica, ya que genera mutaciones aleatorias que incluyen reordenamientos cromosómicos, entre los cuales se encuentran los cambios genéticos raros, que son los responsables de orquestar las capacidades distintivas del cáncer y finalmente la progresión de la enfermedad (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por lo tanto, se ha concluido que los defectos en el mantenimiento y reparación del genoma son selectivamente ventajosos para la progresión tumoral, aunque sea porque

aceleran la velocidad a la que las células premalignas en evolución pueden acumular genotipos favorables para el cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011; Killcoyne et al., 2021).

### **1. 5 Paradoja de la inestabilidad genómica en células de cáncer**

A pesar de la ubicuidad de la inestabilidad genómica en tumores humanos, la inducción de aneuploidía generalmente disminuye la capacidad proliferativa de la célula, ya que se ha observado que las células aneuploides genéticamente modificadas suelen tener una aptitud fisiológica y una tumorigenicidad disminuida (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011; J. Sheltzer et al., 2017).

Las células humanas y de ratón que portan un único cromosoma adicional, exhiben un retraso pronunciado en el ciclo celular, estrés proteotóxico, alteraciones metabólicas e inestabilidad genómica (Chunduri & Storchová, 2019; Pavelka et al., 2010; Stingele et al., 2012). En general se sugiere que la aneuploidía es capaz de funcionar como un supresor de tumores (Vasudevan et al., 2021).

Aunque la aneuploidía es perjudicial para las células en la mayoría de los casos, también se ha descubierto que proporciona una ventaja selectiva para adaptarse a entornos con condiciones estresantes, ya que la CIN proporciona la plasticidad fenotípica para tolerar el estrés (Ippolito et al., 2021; Lukow et al., 2021; Vasudevan et al., 2021).

Estudios previos en levaduras han reconocido los cambios en la organización genómica y el número de copias como contribuyentes importantes en la resistencia a los antifúngicos (Pavelka et al., 2010; Selmecki et al., 2009). De hecho, la amplificación de un solo cromosoma, i(5L) un isocromosoma compuesto por dos brazos cromosómicos idénticos (Chr5L) en la levadura *Candida albicans*, se asoció con la adquisición de resistencia al fluconazol y la presencia de esta amplificación correlacionó con concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) más altas de fluconazol y de forma contrario, la pérdida de i(5L) correlacionó con una caída en los niveles de MIC del fluconazol (Selmecki et al., 2009).

Se ha demostrado que las células de cáncer podrían aprovechar la inestabilidad genómica inducida por la aneuploidía y los cambios resultantes en el número de copias genéticas para sobrevivir en condiciones de estrés, la quimioterapia actúa a modo de presión selectiva, similarmente a como ocurre con la resistencia a los antibióticos y a los antifúngicos. Además, la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos estuvo determinada por la adquisición de cariotipos recurrentes, lo que indica que la dosis genética podría desempeñar un papel en el impulso de la quimiorresistencia (Ippolito et al., 2021).

Ippolito et al. (2021) plantearon un modelo en el que se sugiere que el aumento de la velocidad de una inadecuada segregación cromosómica en una población celular lleva a un aumento de la heterogeneidad cariotípica. En este estado, la población celular es genómicamente muy inestable, una condición que podría ser desfavorable para la proliferación celular; pero que otorga un amplio surtido de diferentes cariotipos, dentro de los cuales se podría encontrar un genotipo adecuado para la sobrevivencia de la célula en presencia de un agente quimioterapéutico.

El aumento en la heterogeneidad intratumoral, permite aumentar la diversidad genética y fenotípica del tumor y por lo tanto, al aplicar una presión selectiva como un agente quimioterapéutico, es posible que se seleccionen únicamente los clones cuyo genotipo y fenotipo les confiera quimiorresistencia y finalmente, ese clon será el responsable que repoblar un tumor. Esto podría justificar las observaciones previas, donde se ha demostrado que el aumento de la CIN correlaciona con mal pronóstico de los pacientes con cáncer y respuestas deficientes en numerosos tratamientos para tumores humanos (Ippolito et al., 2021; Lukow et al., 2021; Vasudevan et al., 2021).

Estas observaciones han sido respaldadas por otros estudios, donde se ha demostrado que la inducción de CIN de forma exógena puede acelerar la adquisición de resistencia a terapias dirigidas como Vemurafenib y terapias citotóxicas como Paclitaxel y Doxorubicina.

Se utilizaron diferentes enfoques de inducción de CIN, diferentes líneas celulares y diferentes terapias contra el cáncer, lo que resalta la generalización de este fenómeno como causa de fracaso en la terapia contra el cáncer. Se sugiere que la CIN no proporciona resistencia "*intrínseca*" a las terapias contra el cáncer, sino que confiere una plasticidad genómica a las células cancerosas que les permite adquirir aneuploidías beneficiosas (Lukow et al., 2021).

Por lo tanto, la propuesta más aceptada es que la aneuploidía tiene tanto propiedades antitumorales como protumorales, ya que aunque la mayoría de las aneuploidías llevan a muerte celular o senescencia es posible que ocurra un evento relativamente raro, que permita el surgimiento de cariotipos con propiedades proliferativas, cambios favorables en las dosis génicas y sobreexpresión de oncogenes, con capacidad de evadir el sistema inmune y resistir la terapia. Estas aneuploidías se pueden ir seleccionando con el tiempo, se dice que se requieren muchas generaciones para poder establecer patrones de expresión genética que permitan el crecimiento celular de las células de cáncer (Vasudevan et al., 2021).

### **1. 6 Ante la paradoja: hipótesis de la compensación de dosis génica**

La aneuploidía afecta la expresión no solo de los genes ubicados en los cromosomas aneuploides, sino también en muchos otros genes de todo el genoma (Dürrbaum & Storchová, 2016; Stingle et al., 2012; Torres et al., 2007). Uno de los posibles orígenes de esta desregulación genética global proviene de los reguladores transcripcionales, los cuales se encuentran en las regiones cromosómicas aneuploides y pueden afectar la expresión de genes en cualquier otra región del genoma (Dürrbaum & Storchová, 2016; J. M. Sheltzer et al., 2012).

La aneuploidía altera la dosis de cientos o miles de genes de forma simultánea, lo que aumenta los requisitos metabólicos de la célula y lleva a problemas generalizados en la producción, plegamiento y recambio de proteínas (Donnelly et al., 2014; Santaguida et al., 2015). Así mismo, se desencadena un programa transcripcional que implica la regulación

positiva de genes de respuesta al estrés y una regulación negativa de los genes del ciclo celular, que a menudo lleva a detención del ciclo celular y senescencia (Lukow et al., 2021; Santaguida et al., 2015; Stingele et al., 2012).

Además, aunque el patrón de respuesta de la aneuploidía es uniforme, no existe una superposición significativa de los genes individuales desregulados, lo que indica que existen consecuencias fisiológicas comunes para la aneuploidía, pero que las vías por las cuales se logra el cambio del fenotipo difieren. Posiblemente debido a determinantes moleculares específicos que son afectados por la composición cariotípica (Dürbaum & Storchová, 2016).

Dentro del caos de inestabilidad genómica inducida por la CIN se han evidenciado ciertos patrones conservados que sugieren la presencia de un mecanismo estable, cuya función es asegurar la supervivencia celular y lidiar con los efectos negativos de la aneuploidía (Ozery-Flato et al., 2011).

Una posible explicación de cómo las células de cáncer lidian con la inestabilidad genómica es la hipótesis de la compensación de dosis génica (Kojima & Cimini, 2019). De hecho, se ha planteado que la aneuploidía promueve el desarrollo de tumores aumentando la dosis de oncogenes que promueven el crecimiento y disminuyendo la dosis de supresores de tumores, que inhiben el crecimiento. Sin embargo, la identidad de los genes reguladores de este proceso aún no se conoce (Lukow et al., 2021; Schukken & Sheltzer, 2022).

La compensación de dosis génica es un mecanismo por el cual la expresión de ciertos genes es modulada para compensar las diferencias en la dosis génica, el ejemplo clásico de compensación de dosis génica es el observado en organismos con sistemas de determinación del sexo. De hecho, en ciertos modelos experimentales, este fenómeno de compensación de dosis parece ser amplio y afectar a una gran fracción del contenido de los genes del cariotipo aneuploide (Kojima & Cimini, 2019).

Hay evidencia del efecto de la compensación de dosis génica en la expresión génica, rasgos cuantitativos, síndromes aneuploides, dinámica poblacional y el destino evolutivo diferencial de genes (Veitia et al., 2008). Las alteraciones en la dosis génica afectan la aptitud celular de distintas maneras (J. Sheltzer & Amon, 2011).

1. Provoca cambios en la concentración de una proteína en particular, por lo que puede modular directamente la eficiencia de la función celular de esa proteína.
2. Induce cambios en el número de copias de genes que pueden afectar la formación o función de complejos sensibles a la estequiometría.
3. Cambia la susceptibilidad de algunas proteínas de realizar interacciones moleculares promiscuas con otras proteínas, es decir, las proteínas pueden interactuar con más de un blanco, alterando el interactoma celular al cambiar el número de copias del gen.
4. Puede alterar la proliferación celular a través de la acumulación de proteínas plegadas o agregadas incorrectamente, es decir, la sobreexpresión de una proteína supera la capacidad de las chaperonas encargadas de plegarla correctamente, lo que lleva a fenotipos de pérdida de función y agregados proteicos potencialmente citotóxicos.
5. El exceso de proteínas puede afectar los mecanismos de degradación proteica, por lo que no todas las proteínas de las células aneuploides se sobreexpresan proporcionalmente y la mayoría de las proteínas con dosis compensada son miembros de complejos proteicos. El desequilibrio estequiométrico inducido por la aneuploidía puede estresar gravemente el proteosoma celular.
6. Afecta significativamente el metabolismo y aumenta las necesidades de energía celular, posiblemente las células gastan su energía en traducir y degradar el exceso de proteínas codificadas en los cromosomas adicionales.

Se ha demostrado que los genes con compensación de dosis génica constituyen aproximadamente el 10% del genoma y consisten predominantemente en subunidades de

complejos multiproteicos, que están regulados en una manera dependiente de la estequiometría (Ishikawa et al., 2017).

En células humanas aneuploides, se ha demostrado que niveles de ARNm por lo general correlaciona bien con el número de copias incrementado de ADN (dosis génica), mientras que la abundancia de algunas proteínas se reduce hacia niveles diploides (Stingele et al., 2012). Además, se ha identificado que las proteínas codificadas en el exceso de cromosomas forman agregados en las células aneuploides, esta agregación explica por qué el estrés proteotóxico es una característica universal de la aneuploidía y revela la agregación de proteínas como una forma de compensación de dosis casi tan efectiva como la degradación de proteínas, en la disminución del nivel de proteína en exceso (Brennan et al., 2019).

Aunque la mayoría de los genes son compensados a nivel proteico, otros pocos son también compensados a nivel de ARNm (Stingele et al., 2012). Un reporte de aislamientos de levaduras aneuploides ambientales mostró compensación de dosis génica en 10-30% de los genes amplificadas en comparación con cepas isogénicas o euploides cercanamente relacionadas. Lo que evidencia que la aneuploidía no llevaba a defectos en el crecimiento; por lo que se propuso que el mecanismo de compensación de dosis génica es probablemente debido a mecanismos de retrocontrol (Hose et al., 2015).

Nuestro grupo de investigación en la Universidad de Costa Rica previamente ha trabajado en la identificación de estos mecanismos de compensación de dosis génica mediante el análisis de datos genómicos y transcriptómicos del panel de líneas celulares de cáncer NCI60 (Shoemaker, 2006). De dichos estudios se ha identificado un clúster de genes con baja tolerancia a la variación en los niveles de expresión, a pesar de una gran variación en el número de copias. Estos genes están distribuidos a lo largo de varias localizaciones cromosómicas y, de hecho, sus números de copia tienen un coeficiente de correlación positiva o negativa con los niveles de expresión de varios microARNs (MIRs) y factores de

transcripción (FT). La mayoría de las correlaciones no corresponden a interacciones directas con los genes blanco, sugiriendo que la compensación de dosis génica puede ser mediada por una compleja red de MIRs y FT (M. Acón et al., 2020; M. S. Acón et al., 2018).

### **1. 7 El daño genotóxico como inductor de inestabilidad genómica**

Los seres vivos se exponen constantemente a una amplia gama de procesos y agentes capaces de dañar el ADN (agentes genotóxicos), derivados tanto de fuentes exógenas como endógenas (Jackson & Bartek, 2009). Una de las fuentes exógenas más importantes de daño al ADN, son los agentes quimioterapéuticos, cuyo éxito terapéutico radica en la capacidad de dañar el ADN de las células de cáncer y cuyo efecto secundario principal, también radica, en esta misma capacidad (Chabner & Roberts, 2005).

El daño al ADN activa la respuesta al daño al ADN (o DDR por sus siglas en inglés), la cual se describe como una intrincada red intracelular que coordina procesos de arresto del ciclo celular, reparación del daño, cambios en el manejo energético de la célula e inducción de muerte celular y senescencia (Jackson & Bartek, 2009; Lord & Ashworth, 2012).

Las alteraciones en el ADN promueven la proliferación de las células cancerosas mediante la acumulación de aberraciones impulsoras, incluidos cambios en el número de copias de genes, reordenamientos y mutaciones; sin embargo, estos mismos defectos también crean vulnerabilidades que son relativamente específicas de las células cancerosas, y potencialmente podrían explotarse como blanco terapéuticos, con el fin de aumentar el índice terapéutico de los tratamientos contra el cáncer y, mejorar los resultados en los pacientes (Man-Sai et al., 2016).

Como se describió anteriormente, la aneuploidía exhibe tanto propiedades protumorales como antitumorales. De hecho, la quimioterapia y la radioterapia, tratamientos ampliamente utilizados en el abordaje del paciente con cáncer, aprovechan las características antitumorales de la CIN y la aneuploidía, al inducir inestabilidad genómica en dosis letales

para las células. Esta dosis tóxica puede ser suficientes para inducir la muerte de las células de cáncer e inducir la regresión del tumor, debido a que las células tanto tumorales como sanas, son incapaces de tolerar tanta inestabilidad genómica (Vargas-Rondón et al., 2018).

Sin embargo, puede ocurrir que la distribución de la dosis de la quimioterapia o la radiación no sea homogénea para todas las células del cáncer, por lo que algunas células de cáncer se exponen a dosis subletales, esto permite la fijación de nuevas alteraciones estructurales y numéricas, así como la ganancia de nuevas mutaciones y alteraciones oncogénicas. Finalmente, esto se traduce en una mayor heterogeneidad intratumoral y resistencia a la terapia. La administración de la terapia puede actuar como una presión selectiva, lo que permite la selección de un clon celular capaz de tolerar tanto la quimioterapia o la radiación, así como la inestabilidad inducida por éstas (Vargas-Rondón et al., 2018).

La quimioterapia y la radioterapia han sido estrategias terapéuticas centrales para la mayoría de paciente con cáncer, la resistencia a estas terapias puede llevar a fallo terapéutico y la progresión tumoral (Ippolito et al., 2021). Estudios han identificado en líneas celulares de cáncer aneuploide, un aumento de la resistencia a múltiples quimioterapias y drogas en general (Cohen-Sharir et al., 2021; Replogle et al., 2020).

De hecho, se ha demostrado que la ganancia de 1 solo cromosoma lleva a un aumento en la resistencia a quimioterapéuticos de primera línea como cisplatino y paclitaxel. Se ha propuesto que el retraso en la fase G1 que ocurre en células aneuploides podría ser la causa de la resistencia a la quimioterapia en comparación con células euploides. El mecanismo que se plantea es que el retraso en G1 aumenta la resistencia a cisplatino y paclitaxel al reducir su habilidad de dañar el ADN y los microtúbulos, respectivamente (Replogle et al., 2020).

Se ha estudiado formalmente la relación entre la aneuploidía y la quimiorresistencia. El modelo que se ha planteado sugiere que, en un panel tumoral de células aneuploides, cuando se aumenta la tasa de segregación errónea, aumenta la heterogeneidad intracelular y

al aplicar una presión selectiva, como la exposición a quimioterapéuticos, se selecciona un clon o pocos clones celulares con cariotipos resistentes y recurrentes. Por lo tanto, las condiciones que induzcan errores mitóticos tienen un efecto beneficioso sobre las células de cáncer, ya que permiten aumentar la variabilidad genética y fenotípica y posteriormente, al exponer dichas células a una condición estresante, en esa variabilidad, es más probable encontrar un genotipo capaz de tolerar la condición estresante (Ippolito et al., 2021).

Así mismo, nuestro grupo de investigación ha estudiado las dosis de quimioterapia genotóxica que, aunque son letales para la mayoría de las células, permiten la proliferación celular de subpoblaciones de células en presencia de daños en el ADN no reparados, como lo demuestran los ensayos de supervivencia clonogénica y videomicroscopía de células vivas (Jiménez-Araya et al.; Mora- Cascante et al. Datos no publicados). Lo que sugiere que existen subpoblaciones de células cancerosas que sobreviven y continúan proliferando en presencia de daños no reparados en el ADN, y que posiblemente adquieren nuevas alteraciones genéticas que impulsan las células a fenotipos más agresivos, incluyendo fenotipos quimiorresistentes.

### **1. 8 Cisplatino y el daño genotóxico**

El cisplatino (CPT), también conocido como cis-diaminodicloroplatino (II) es un compuesto de coordinación metálico (platino). Su nombre original fue *sal de Peyrone*, debido a que fue sintetizado por primera vez por Michele Peyrone. Su estructura fue descrita por Alfred Werner en 1893, sin embargo, no ganó atención hasta 1965 cuando Barnett Rosenberg y otros investigadores observaron que algunos productos a base de platino eran capaces de inhibir la división celular de *Escherichia coli*, lo que generó mucho interés en posibles usos como agente citotóxico para el tratamiento del cáncer (Dasari & Tchounwou, 2014).

Los compuestos a base de metales se han utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de muchas enfermedades, sin embargo, para el tratamiento del cáncer el CPT

tiene beneficios citotóxicos a diferencia de cualquier otro metal, debido a una mayor selectividad, menor toxicidad y un espectro de actividad más amplio (Forgie et al., 2022).

En 1978 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó el CPT como tratamiento del cáncer y fue el primer compuesto de platino aprobado para este fin, lo que generó mucho interés en compuestos de platino (II) u otros metales, como posibles fármacos anticancerígenos. De hecho, se han desarrollado otros análogos de platino, pero solo el carboplatino y oxaliplatino han sido aprobados globalmente para su uso a nivel clínico (Dasari & Tchounwou, 2014; Forgie et al., 2022).

Los fármacos a base de platino se han mantenido como fármacos anticancerígenos destacados, eficaces y ampliamente utilizados; principalmente en el tratamiento de muchos tumores sólidos, incluidos los cánceres de testículo, ovario, vejiga y colorrectal (Forgie et al., 2022). Así como otros tipos de neoplasias, como cáncer de cabeza y cuello, de mama, cerebro, riñón, entre otros (Dasari & Tchounwou, 2014).

Tanto el CPT, como el carboplatino y oxaliplatino son conocidos porque actúan canónicamente mediante la generación de aductos de ADN que provocan daños genómicos; sin embargo, el alcance de su citotoxicidad dentro de la célula es mucho más amplio y no se limita únicamente al núcleo (Forgie et al., 2022).

El CPT es comúnmente administrado en dosis de 60-40 mg/m<sup>2</sup>, mediante una infusión intravenosa constante de 90 minutos, por 3-5 días consecutivos cada 3 semanas (Charlier et al., 2004). En sangre aproximadamente el 90% es secuestrado por las proteínas plasmáticas, dejando solo el 10% para acceder a los tejidos (DeConti et al., 1973; Forgie et al., 2022). El rango terapéutico del cisplatino, medido en sangre, se encuentra entre 1.0 - 5.0 mg/L (Charlier et al., 2004; Forgie et al., 2022).

El mecanismo por el que ingresa a la célula actualmente se encuentra en debate, inicialmente se pensó que el mecanismo principal era la difusión pasiva, ya que al ser una molécula pequeña y sin carga puede atravesar fácilmente las membranas lipídicas (Eljack et al., 2014). Sin embargo, se han reconocido otros mecanismos que involucran transportadores de membrana específicos, entre ellos destaca la proteína 1 de absorción de cobre de alta afinidad (CTR1) y la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPasa (P. A. Andrews et al., 1991; Ishida et al., 2002). Además, puede ser expulsado de la célula mediante bombas de eflujo como ATPase copper transporting alpha (ATP7A) y la proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos (MRP2) (Forgie et al., 2022).

El mecanismo mejor estudiado de muerte celular mediada por CPT es el daño al ADN nuclear después de la captación intracelular. Desde los años 70 se conoce la capacidad del CPT de dañar el ADN y se considera el principal mecanismo de toxicidad del CPT (Forgie et al., 2022).

En plasma el CPT es poco reactivo, debido a la alta concentración de cloruro que evita el desplazamiento de los grupos cloruro. Dentro de la célula, la concentración de cloruro disminuye y esto favorece la hidratación del CPT. Esto da como resultado un electrófilo potente capaz de unirse a una variedad de constituyentes celulares, entre los cuales se encuentran los sitios N7 altamente nucleofílicos de las purinas del ADN. También puede unirse al surco mayor de la hélice del ADN, lo que permite la formación de aductos, entre los que destacan principalmente: entrecruzamiento intra-hebra, entrecruzamiento entre-hebras y aductos monofuncionales (Forgie et al., 2022).

Inicialmente, se pensó que los aductos en el ADN eran los responsables de inhibir la síntesis de ADN, mediante el bloqueo de la maquinaria de replicación. Sin embargo, el paradigma cambió cuando Sorenson y Eastman observaron que 1) las células tratadas con CPT normalmente se detienen en fase G2 del ciclo celular y no en fase S, como se esperaba

con la inhibición en la síntesis de ADN y 2) células con defectos en la reparación del ADN, tratadas con CPT podía inducir la detención del crecimiento de G2 y apoptosis y 3) el ADN es capaz de duplicarse aún en células que no se dividían. Por lo que, se propuso que la inhibición de la transcripción es el mecanismo clave de la toxicidad del CPT (Forgie et al., 2022; Sorenson & Eastman, 1988a, 1988b).

La forma en que el CPT media la muerte celular depende no sólo de las lesiones del ADN en sí mismas sino también de cómo la célula elige responder al daño. En casos de daño tolerable de corta duración, la célula puede activar mecanismos de reparación y detención del ciclo celular. En casos de daño sostenido absoluto, la célula puede activar vías proapoptóticas (Forgie et al., 2022).

Una de las estrategias por la cual las células pueden resistir el tratamiento con CPT es el aumento en los mecanismos de reparación del ADN. Los entrecruzamientos son principalmente reparados a través de la vía de escisión de nucleótidos (NER). Aunque también participan otros mecanismos como recombinación homóloga (HR), que implica la formación de roturas de doble banda en el ADN y la vía de reparación de pares erróneos o Mismatch repair (MMR), sin embargo, esta última vía no puede reparar eficazmente los aductos de CPT, lo que contribuye a la citotoxicidad del CPT al generar señales de muerte celular (Forgie et al., 2022).

Así mismo, se debe destacar que el CPT actúa no solo mediante la inhibición de la transcripción inducida por el daño en el ADN y la señal apoptótica, si no, que también puede inducir estrés en el retículo endoplásmico, daño al ADN mitocondrial que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y finalmente, puede unirse a componentes de la membrana plasmática y del citoesqueleto (Dasari & Tchounwou, 2014; Forgie et al., 2022).

## 1. 9 Etopósido y el daño genotóxico

La naturaleza bicatenaria del ADN genera algunas dificultades para llevar a cabo algunos procesos celulares como replicación, reparación, transcripción y segregación cromosómica, ya que durante estos procesos celulares se debe abrir la doble hebra del ADN, generando un sobrenrollamiento en otros sitios de la molécula. Lo anterior genera un problema de estrés topológico que debe ser resuelto por la célula de una forma energéticamente favorable (Mehta et al., 2018; Nitiss, 2009).

La célula resuelve el estrés topológico generado durante la apertura de la doble hebra mediante las *ADN topoisomerasas* (TOPO), las cuales son enzimas de múltiples subunidades que requieren ATP para ejercer su actividad catalítica y modulan la topología del ADN al generar rupturas transitorias en las hebras del ADN. Se han descrito 2 clases de topoisomerasas: tipo I que introducen rupturas en 1 sola cadena (TOPO I) y tipo II (TOPO II) que introducen rupturas de cadena doble (Hande, 1998; Lord & Ashworth, 2012; Nitiss, 2009).

El ciclo catalítico de la TOPO II inicia con el reconocimiento y la unión de 2 de las subunidades de la enzima a la molécula de ADN. Seguidamente, en presencia de un catión divalente, las 2 subunidades catalíticas escinden una de las hebras de la doble hélice; los 2 enlaces escindibles están ubicados a 4 pares de bases de distancia uno del otro, directamente a través del surco principal. Por lo que la escisión genera moléculas de ADN con extremos cohesivos monocatenarios de 4 pares de bases en sus extremos 5'. Esta reacción es reversible y hay un equilibrio entre la escisión y la religación del ADN.

Después, la TOPO II une 2 moléculas de ATP lo que permite un cambio conformacional, que provoca el paso del segmento intacto de ADN a través de la doble hélice escindida. El ADN se transporta por la cavidad central de la TOPO II a través de una puerta N-terminal. La puerta se cierra y se forma un tipo de abrazadera sobre el ADN. Después de

translocar el ADN, la TOPO II vuelve a sellar la ruptura de la molécula. Luego se hidroliza la segunda molécula de ATP, lo que abre la puerta C-terminal y permite el transporte del segmento de ADN para ser liberado. Finalmente, la enzima vuelve a su conformación inicial y recupera la capacidad para iniciar una nueva ronda de catálisis (Baldwin & Osheroff, 2005).

Se conoce que los complejos de escisión de ADN-TOPO II son en condiciones normales intermediarios transitorios en el ciclo catalítico de la TOPO II y están presentes en bajas concentraciones celulares. Sin embargo, cuando estos complejos aumentan pueden generar rupturas permanentes en la cadena de ADN, que desencadenan vías de recombinación y reparación del ADN o vías de muerte celular (Baldwin & Osheroff, 2005).

Dado que una ruptura de doble banda sin reparar puede tener consecuencias potencialmente letales para la célula, las TOPO II podrían constituir una forma particularmente peligrosa de abordar los problemas topológicos de la célula (Nitiss, 2009). En condiciones de estrés, como exposición a pH ácido, estrés oxidativo, entre otros, las TOPO II se pueden convertir en nucleasas, lo que puede resultar en la muerte de la célula y/o inestabilidad genómica (T. K. Li & Liu, 2003). De hecho, esta particularidad de las TOPO II es la que permitió explorar el potencial citotóxico de esas enzimas en el desarrollo de fármacos antitumorales (Montecucco & Biamonti, 2007).

Los fármacos dirigidos específicamente hacia la TOPO II se pueden agrupar en: *inhibidores catalíticos o venenos*, según su mecanismo de acción (Montecucco & Biamonti, 2007). Los inhibidores catalíticos impiden un paso catalítico en el ciclo de la reacción de la enzima. Por otro lado, los venenos estabilizan los intermediarios transitorios en los que la enzima está unida al ADN y, por lo tanto, desencadenan rupturas de doble banda, esencialmente convirtiendo la enzima topoisomerasa en un agente que daña el ADN (Mehta et al., 2018).

La podofilotoxina es un producto natural encontrado en la planta *Podophyllum peltatum*, más comúnmente conocido como mandrágora o manzana de mayo. Las podofilotoxinas se han usado como un remedio popular para una variedad de enfermedades por más de 100 años. Se conocían bien sus propiedades antimitóticas, relacionadas a su capacidad de inhibir la polimerización de la tubulina. Si bien, demostró potencial como agente antineoplásico, su uso estaba prohibido debido a la alta toxicidad asociada (Hande, 1998).

A partir de estos descubrimientos, se empezaron a desarrollar derivados semisintéticos de la podofilotoxina con el fin de generar una molécula con las propiedades antineoplásicas y con menor toxicidad. Lo que llevó al desarrollo de dos análogos con mayor actividad antineoplásica y menor toxicidad, el etopósido (ETO) en 1966 y tenipósido en 1967. La FDA aprobó el ETO con el nombre comercial de VePesid en 1983. Interesantemente en el momento de la aprobación, el mecanismo de acción de este fármaco y su farmacología apenas comenzaban a definirse. Se sabía que, en contraste con la podofilotoxina, el ETO no inhibía la polimerización de la tubulina y fue hasta mediados de 1980 que se determinó el blanco principal del ETO (Baldwin & Osheroff, 2005; Hande, 1998).

Desde su aprobación el ETO se ha utilizado como agente citotóxico en el tratamiento de un amplio espectro de cánceres, principalmente leucemia mieloide aguda, linfomas, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, cáncer gástrico, de mama, de ovario y de testículo (Hande, 1998; Joel et al., 1994).

El ETO se administra comúnmente vía intravenosa u oral y la concentración varía según el tipo de tumor, ya que los efectos del ETO dependen del cronograma de administración. Así mismo, la eficacia del fármaco depende de la dosis como el tiempo de exposición. La administración intravenosa de 30 minutos, por 5 días de 100 mg/m<sup>2</sup> se

considera una dosis tolerable, antes de que aparezca los efectos secundarios que limitan la dosis (Carney, 1991; Thompson et al., 1995).

Se ha demostrado *in vitro* que el ETO es un veneno de la TOPO II ya que aumenta las rupturas del ADN al inhibir la capacidad de la enzima de religar las moléculas de ADN escindidas. La causa de la muerte celular inducida por ETO es el aumento de los niveles de los complejos de escisión ADN-TOPO II (Baldwin & Osheroff, 2005; Burden et al., 1996). De hecho, en presencia del fármaco hay formación de un complejo ternario, ADN-ETO-TOPO II. Este complejo se puede formar mediante 3 vías distintas: unirse a la enzima libre, al complejo de escisión ADN-TOPO II o bien unirse directamente al ADN. En contraste con otros venenos de la TOPO II, el ETO tiene un poco de capacidad de interactuar con el ADN libre (Baldwin & Osheroff, 2005).

La formación del complejo ternario, TOPO II-ETO-ADN, es crítico para la escisión del ADN. El ETO se une al complejo a través de una interacción directa con el monómero enzimático unido a ATP, de la TOPO II, de tal manera que cada molécula del fármaco estabiliza solo una ruptura monocatenaria (Bromberg et al., 2003; Vilain et al., 2003). Dependiendo de la relación molar entre el ETO y la TOPO II, se generan rupturas del ADN monocatenario o bicatenario, por esta razón la eficacia es dependiente de la dosis y tiempo de exposición (Montecucco & Biamonti, 2007).

El ETO no produce un bloqueo inmediato de la síntesis de ADN como ocurre con inhibidores de la ADN polimerasa, como la afidicolina, si no que induce una inhibición progresiva de la replicación del ADN, que se logra detectar después de la formación de focos de la proteína de replicación A (RPA). Lo que podría llevar al arresto en fase G2 y S del ciclo celular observado después del tratamiento con este fármaco (Montecucco & Biamonti, 2007).

Así mismo, se ha demostrado que uno de los efectos de las rupturas de doble banda inducidas por ETO es la fosforilación de la proteína de mantenimiento estructural de los

cromosomas (Smc1). Además, ETO induce la formación de focos de heterocromatina asociados a apoptosis y el silenciamiento génico. Por lo que el daño al ADN causado por el fármaco podría afectar la organización de la cromatina (Montecucco & Biamonti, 2007).

Los mecanismos de reparación que se activan en la célula en presencia de ETO son principalmente las vías de recombinación, como recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Baldwin & Osheroff, 2005).

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

La inestabilidad genómica es un fenómeno ampliamente reconocido en las células tumorales y está asociada con peores pronósticos clínicos en pacientes con cáncer. Diversos estudios retrospectivos y prospectivos han demostrado que un aumento en la inestabilidad genómica se correlaciona con mayor quimioresistencia y mayor potencial para el desarrollo de metástasis.

A pesar de ser un fenómeno bien documentado en células cancerosas, la inestabilidad genómica en tumores humanos sigue siendo en gran medida un misterio para la comunidad científica, pues aún no se han identificado los mecanismos específicos que permiten a las células tumorales tolerar dosis de inestabilidad genómica mucho más altas que las que pueden soportar las células normales. En las células sanas, incluso una alteración puntual en ciertas regiones cromosómicas puede llevar no solo a la muerte celular, sino también a la muerte del organismo. Sin embargo, las células tumorales parecen escapar a este destino fatal.

Una posible explicación a esta paradoja, de las células de cáncer, es la hipótesis de la compensación de dosis génica, que describe una red de interacciones moleculares que permiten regular y tolerar los cambios en las dosis génicas. A través de estudios *in silico*, se ha identificado un grupo de genes que muestran baja tolerancia a variaciones en los niveles de expresión, a pesar de una gran variabilidad en el número de copias, lo que sugiere que existe una regulación fina en los niveles de expresión génica.

A nuestro conocimiento no se han realizado estudios que permitan identificar *in vitro* genes que puedan estar bajo el fenómeno de compensación de dosis génica en un modelo celular de cáncer. De manera adicional, nuestra propuesta presenta la ventaja sobre estudios previos de que nuestra comparación se basa en células con el mismo trasfondo genético, ya que se propone inducir variantes de número de copias a través de un aumento de aneuploidía derivada del tratamiento quimioterapéutico, lo que reduce la influencia de otros factores

sobre el número de copias y los niveles de expresión de un gen particular, como es el caso de identificar candidatos bajo compensación mediante la comparación de líneas o muestras de pacientes con un trasfondo genético distinto.

Por otro lado, las quimioterapias genotóxicas son una de las principales fuentes de inestabilidad genómica. A lo largo de los años, estas han sido fundamentales en el tratamiento de pacientes con cáncer, debido a su capacidad para inducir niveles intolerables de inestabilidad genómica, incluso en las células tumorales, lo que finalmente lleva a la muerte celular y a la regresión tumoral. Sin embargo, algunas células tumorales pueden estar expuestas a dosis subletales de quimioterapia, especialmente en tumores sólidos con una estructura heterogénea, lo que les permite adquirir y fijar nuevas mutaciones, favoreciendo la resistencia al tratamiento.

La estandarización de un modelo de inestabilidad genómica acelerada, mediante el tratamiento con dosis subletales de quimioterapia genotóxica, permite estudiar el fenómeno de compensación de dosis génica, el cual podría explicar cómo las células tumorales son capaces de tolerar altos niveles de inestabilidad genómica. Este modelo *in vitro* refleja un fenómeno que ocurre *in vivo*, en el que algunas células tumorales expuestas a dosis subletales de quimioterapia incrementan su inestabilidad genómica, lo que puede llevar a la quimioresistencia y al fracaso terapéutico.

Por lo tanto, el presente trabajo plantea la hipótesis de que, ante el daño genotóxico, las células de cáncer de mama inducen el fenómeno de compensación de dosis génica, que podría contribuir al proceso de proliferación celular.

## **CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3. 1 Hipótesis**

Ante daño genotóxico las células de cáncer de mama inducen fenómenos de compensación de dosis génica que contribuyen al proceso de proliferación celular.

### **3. 2 Objetivo General**

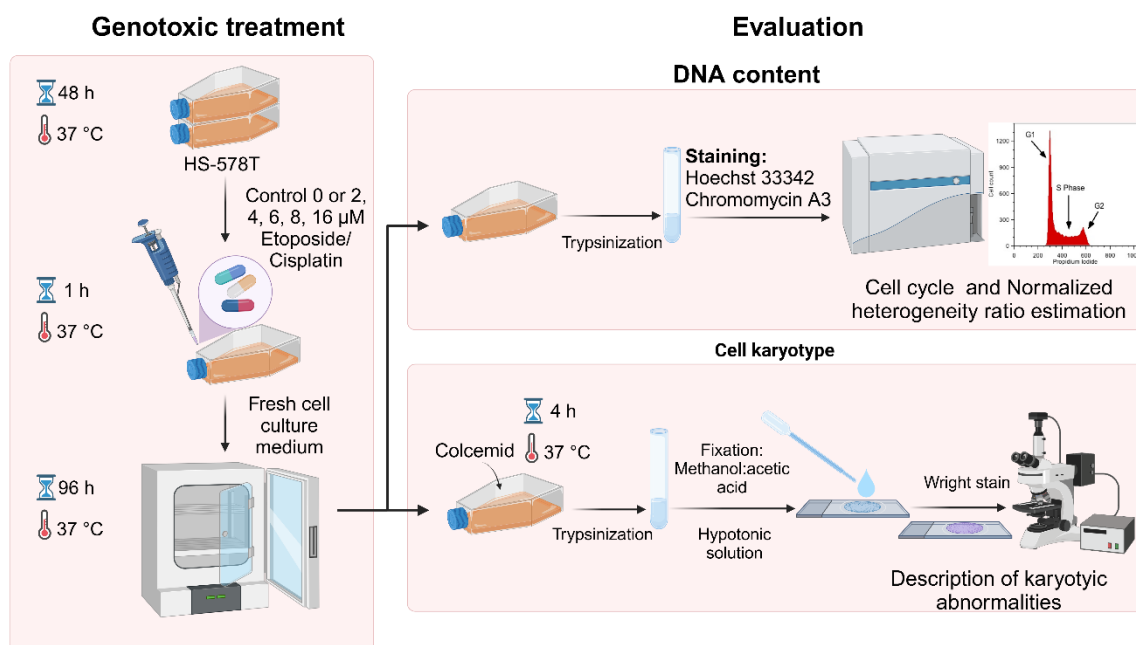
Identificar genes candidatos de compensación de dosis génica mediante el tratamiento con dosis subletales de quimioterapia genotóxica, para el estudio de posibles puntos de control.

### **3. 3 Objetivos Específicos**

1. Establecer un modelo de estudio de inestabilidad genómica acelerada mediante el tratamiento de células de cáncer de mama con dosis subletales de quimioterapia genotóxica, que permita el estudio del fenómeno de compensación de dosis génica.
2. Analizar la expresión transcripcional de células de cáncer de mama en el modelo de inestabilidad genómica acelerada, para obtener información de la expresión génica de dichas células ante el tratamiento subletal genotóxico.
3. Analizar el exoma de células de cáncer de mama en el modelo de inestabilidad genómica acelerada, para obtener información de la variación en el número de copias de dichas células ante el tratamiento subletal genotóxico.
4. Identificar genes candidatos de compensación de dosis génica mediante el análisis de la expresión y el número de copias en células de cáncer expuestas a dosis subletales de quimioterapia genotóxica, para el estudio de posibles puntos de control.

## CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Modelo de inestabilidad genómica acelerada



**Figura 1. Estandarización de un modelo *in vitro* de inestabilidad genómica acelerada.** Se realizó un tratamiento con quimioterapia genotóxica en la línea celular de cáncer de mama HS- 578T, perteneciente al Panel NCI60. El efecto del tratamiento se evaluó mediante dos parámetros principales: 1) ciclo celular, donde se cuantificó del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y el cálculo de un índice de heterogeneidad normalizado, y 2) cariotipo celular, donde se describieron las alteraciones estructurales inducidas en el cariotipo celular por el tratamiento genotóxico. Elaboración propia con Biorender.com.

#### 4.1.1 Tratamiento genotóxico

##### 4.1.1.1 Cultivo celular

Las células de cáncer de mama HS-578T se obtuvieron del Panel NCI60 del Instituto Nacional del Cáncer. Se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute sin rojo fenol (RPMI 1640, Gibco; Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco; Life Technologies), 1% de antibiótico-antimicótico de penicilina, estreptomicina y

anfotericina B (Anti-Anti, Gibco; Life Technologies), y 1% de L-alanil-L-glutamina (GlutaMAX, Gibco; Life Technologies). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Para disociar las células adheridas a la placa de cultivo, se utilizó tripsina recombinante (TryPLE™ Express, Gibco; Life Technologies).

#### **4. 1. 1. 2 Tratamiento quimioterapéutico**

A las 48 horas de cultivo y con una confluencia aproximada del 75%, las células se trataron con cisplatino (CPT, Pfizer; 1 mg/dL) o etopósido (ETO, Blau; 20 mg/dL) a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 16 µM. Se utilizó un control sin tratamiento (CNT00), al cual se le añadió únicamente medio RPMI. Tanto las células control como las tratadas se incubaron durante 1 hora (tratamiento de pulso) a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el medio con o sin tratamiento, se añadió RPMI fresco y se incubó por 96 horas en las mismas condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> (Fig. 1).

#### **4. 1. 2 Evaluación del tratamiento**

Para evaluar el efecto genotóxico inducido por el tratamiento con CPT y ETO, se utilizaron dos parámetros generales:

1. **Ciclo celular:** Se estimó mediante la cuantificación del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular y el cálculo de un índice de heterogeneidad normalizado.
2. **Anormalidades estructurales del cariotipo:** Se describieron las alteraciones inducidas por los tratamientos en el cariotipo celular.

#### 4. 1. 2. 1      **Estimación de las fases del ciclo celular**

Los cambios en el contenido de ADN inducidos por las diferentes concentraciones del tratamiento genotóxico se evaluaron mediante la cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y el cálculo de un índice de heterogeneidad normalizado.

Después del tratamiento, las células se recolectaron mediante tripsinización, se centrifugaron y el botón celular se resuspendió en solución salina tamponada con fosfatos, pH 7.4 (PBS, Gibco; Life Technologies). Seguidamente, se agregó etanol al 70% y se congeló a -20°C por un mínimo de 30 minutos y un máximo de 1 semana para fijar el contenido de ADN. Las células fijadas se tiñeron con 50 µg/ml de Cromomicina A3 (Thermo Fisher), 2.5 µg/mL de Hoechst 33342 (Thermo Fisher) y 100 µg/mL de ARNasa (Thermo Fisher) durante 1 hora, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Las lecturas de fluorescencia se realizaron en el citómetro de flujo CytoFLEX LX (Beckman Coulter) y se utilizó el programa CytExpert (Beckman Coulter) para la adquisición y el análisis de los datos. Los eventos se adquirieron con los siguientes parámetros: forward scatter (FSC), side scatter (SSC), UV450 (filtro de detección de Hoechst 33342) y V610 (filtro de detección de Cromomicina A3).

**Ciclo celular.** Para evaluar los cambios en las fases de ciclo celular, se cuantificó el porcentaje de células en cada una de las fases (G1, S y G2/M), conforme se progresa en el ciclo celular, aumenta el contenido de ADN. Para cuantificar el porcentaje de eventos en cada fase del ciclo celular, se realizó una tinción de ADN y se utilizaron únicamente las lecturas de Hoechst 33342, un fluorocromo que se une con mayor afinidad a regiones ricas en AT.

Para el análisis se seleccionaron los canales de lectura UV450 y V610 y la población de interés, se excluyeron los detritos y dobletes, y se recolectaron 10,000 eventos, se graficó el número de eventos versus las lecturas en el canal UV450, correspondiente al canal de

lectura de la tinción de Hoechst 33342 y las fases G1, S y G2/M se identificaron manualmente en el CytExpert (Beckman Coulter) con base en el ciclo celular obtenido para el CNT00.

El ciclo celular se identificó inicialmente para el CNT00 y luego se extrapoló a las condiciones de tratamiento, debido a que los cambios inducidos por los tratamientos generaron ciclos celulares anormales. Seguidamente, se graficó el promedio y el error estándar (SEM) del porcentaje de eventos de cada fase del ciclo celular, de las 4 réplicas independientes, con el programa GraphPad Prism 5 v.5.03 para Windows (GraphPad Software, disponible en [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

**Índice de Heterogeneidad normalizado.** Para analizar la heterogeneidad generada en la población celular y como una medida de la potencial generación de subclones posterior a tratamiento genotóxico subletal, se desarrolló un Índice de Heterogeneidad normalizado (IHn), que se calculó utilizando una doble tinción de ADN con Hoechst 33342 (mayor afinidad por regiones AT) y Cromomicina A3 (mayor afinidad por regiones GC) en las 4 réplicas independientes, utilizando el programa MATLAB v.R2023b.

Para el cálculo del IHn, se emplearon los parámetros de fluorescencia de las dos tinciones de ADN (UV450 para Hoechst 33342 y V610 para Cromomicina A3), obtenidos mediante el citómetro de flujo CytoFLEX LX (Beckman Coulter). Se utilizaron las mismas réplicas y los mismos parámetros de recolección de datos que en el análisis del ciclo celular, con la diferencia de que, para dicho análisis, solo se utilizó la fluorescencia obtenida mediante la tinción de Hoechst 33342.

Se desarrolló un script que permitió seleccionar la subpoblación celular G1, con el fin de limitar el análisis a esta fase del ciclo celular. Para ello, se utilizaron los parámetros de área y altura de los canales UV450 (Hoechst 33342) y V610 (Cromomicina A3), y se programó para que los datos se agruparan en un máximo de 2 subpoblaciones (maxK=2).

Este proceso separó la subpoblación G1 del resto de las subpoblaciones correspondientes a las fases S y G2/M.

A continuación, con el script, se etiquetó cada fase G1 de cada condición y se realizó una mezcla de todas las fases G1 de todas las condiciones experimentales. Luego, se unió el conjunto completo de datos con sus respectivas etiquetas y se separó en un subconjunto con un máximo de 10 subpoblaciones ( $\max K=10$ ). Este subconjunto completo se utilizó para entrenar un modelo de mezclas gaussianas, con un máximo de 10 subpoblaciones celulares y una significancia estadística de 0.01.

A partir del subconjunto de datos (máximo de 10 subpoblaciones), proveniente únicamente de G1, se calculó la *distancia de Mahalanobis*, la cual permite predecir el número de subpoblaciones y la relación entre ellas. También se calcularon algunas estadísticas para optimizar el modelo de mezclas gaussianas, como el *-log likelihood*, que mide la capacidad del modelo para predecir los datos (cuanto menor es el *-log likelihood*, mejor describe el modelo los datos), y el *p value* de la prueba MANOVA, que evalúa si las clasificaciones de los datos producen diferencias estadísticamente significativas (un valor p más bajo indica mayor significancia estadística).

Con el modelo de mezclas gaussianas, se calculó la covarianza para cada una de las subpoblaciones, lo que permitió obtener una medida de la dispersión de los datos de cada subpoblación a través de las 4 dimensiones analizadas, es decir, las 4 lecturas de fluorescencia de las tinciones de ADN.

El modelo de mezclas gaussianas se detuvo cuando se alcanzó el máximo de 10 subpoblaciones o cuando no se cumplió la significancia estadística requerida. De esta forma, se obtuvo para cada condición la frecuencia de aparición de las diferentes subpoblaciones.

Finalmente, se realizó una ponderación de las covarianzas según la frecuencia con la que cada subpoblación celular específica apareció dentro de cada condición. El IHn se definió como la ponderación de la covarianza de cada subpoblación celular, según la frecuencia con la que aparece dentro de una condición.

Los IHn calculados para cada dosis de quimioterapia se normalizaron con respecto al CNT00 sin tratamiento, por lo que un IHn de 1 sugiere que no hay cambios en el número de subpoblaciones, y un IHn > 1 sugiere un aumento en el número de subpoblaciones.

#### **4. 1. 2. 2      Cariotipo celular**








Después del tratamiento genotóxico, las células se arrestaron en metafase con 0.1 µg/ml de Colcemida por 4 horas, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó una tripsinización para recolectar todas las células en solución. Las células fueron centrifugadas y el sobrenadante descartado. Al botón celular se le aplicó un choque hipotónico con una solución de KCl 54 mM y se incubó por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió de manera gentil una solución de metanol/ácido acético 3:1 vol/vol para detener el choque hipotónico y fijar los cromosomas celulares. La mezcla se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados con metanol/ácido acético y en el último lavado, el botón celular se homogenizó cuidadosamente con una micropipeta, para separar las células de forma individual y evitar la presencia los grumos de células y se agregó metanol/ácido acético 3:1 vol/vol.

La solución de células se goteó en forma vertical sobre un portaobjetos utilizando una pipeta Pasteur larga de vidrio, lo que permitió la ruptura de las células al caer sobre el portaobjetos. Posteriormente, se realizó una tinción de Wright, de forma automatizada en Aerospray HematologyPro (Elitech Technology, Inc.) y se obtuvieron imágenes de los cariotipos celulares con una cámara fotográfica (U-TV0.5X-3, OLYMPUS) acoplada a un microscopio de luz (CX31, OLYMPUS).

Seguidamente, se describieron las anormalidades morfológicas observadas en los diferentes tratamientos genotóxicos, utilizando 10 cariotipos celulares seleccionados de forma aleatoria, considerando que las imágenes permitieran la observación individual de los cromosomas. Este análisis se realizó en 3 réplicas independientes en total.

En los cariotipos celulares seleccionados se cuantificó y clasificó manualmente la cantidad de cromosomas anormales. La clasificación de las anormalidades se realizó utilizando como referencia la descrita previamente (Savage, 1975, 1999), la cual se detalla en la Tabla 1. Además, se utilizó Excel de Microsoft para visualizar el promedio de cromosomas en cada clasificación.

**Tabla 1.** Representación gráfica de la guía utilizada para la clasificación de las anomalías estructurales del cariotipo celular. Adaptado de Savage (1975, 1999).

Clasificación	Descripción	Figura de referencia
<b>Normal</b>	1 centrómero, 1 brazo largo y 1 brazo corto de cada cromátide hermana.	
<b>Multicéntrico</b>	Presencia de más de 1 centrómero.	
<b>Delección</b>	Delecciones de los cromosomas	
<b>Forma-anillo</b>	Forma en anillo, completo o incompleto.	
<b>Radial</b>	Incluye estructuras radiales intracromatídicas o intercromatídicas, así como intercambios complejos que involucran más de 2 cromosomas.	
<b>Fragmentado</b>	Fragmentos de cromosomas que carecen de centrómero, se incluyen también las formas en Y.	
<b>Forma-X</b>	Forma en X o en una conformación de flor, ausencia de un centrómero evidente.	
<b>No-clasificado</b>	Incluye todas las formas anormales de un cromosoma que no se pueden clasificar en alguna de las categorías, pero sin embargo tampoco se logran identificar como un cromosoma normal.	No aplica.

#### 4. 1. 3 Selección de las condiciones

Para seleccionar las condiciones genotóxicas que promovieron una mayor inestabilidad genómica, se tomaron en consideración los resultados obtenidos en la estimación de las fases del ciclo celular, el cálculo del IHn y las alteraciones morfológicas observadas en el cariotipo.

## **4. 2 Secuenciación del transcriptoma y exoma completo**

Se realizó la secuenciación tanto del transcriptoma como del exoma completo en las condiciones seleccionadas del modelo de inestabilidad genómica acelerada. Para el análisis de la secuenciación de ARN se llevaron a cabo tres réplicas biológicas por condición, mientras que para la secuenciación del exoma se utilizó una sola réplica por condición.

### **4. 2. 1 Extracción de ARN y ADN**

La extracción de ARN y ADN total se realizó de forma automatizada en el QIAcube Connect (QIAGEN) utilizando el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) para ARN y el kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) para ADN, siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración total de los ácidos nucleicos se cuantificó mediante el método fluorométrico con el Qubit 4 (Thermo Fisher), y la pureza se evaluó con el Nanodrop One/One (Thermo Fisher), utilizando las relaciones 260/280 y 260/230.

### **4. 2. 2 Preparación de la librería genética**

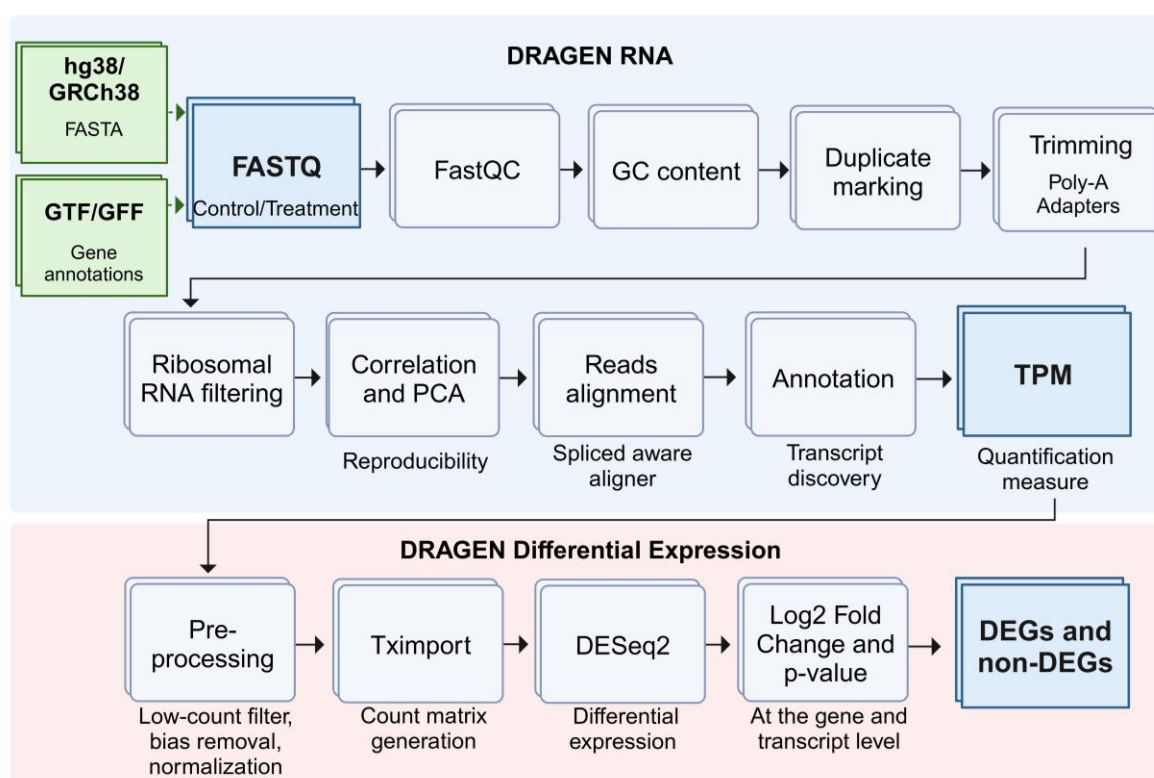
**Transcriptoma.** Se utilizó el kit AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Panel de Illumina para la generación del ADNc (amplificación mediante 13 ciclos de PCR) y la preparación de la librería genética. Se siguió el protocolo del fabricante (documento #1000000039464v06; febrero 2019). Las lecturas se realizaron con una configuración de 2x151 paired-end.

**Exoma.** Se utilizó el kit Illumina DNA Prep with Enrichment para la tagmentación del ADN (amplificación mediante 9 ciclos de PCR) y la preparación de la librería genética. Se

siguió el protocolo del fabricante (documento #1000000048041v06; abril 2021). Las lecturas se realizaron con una configuración de 2x151 paired-end.

### 4. 2. 3 Análisis bioinformático

#### 4. 2. 3. 1 Secuenciación del transcriptoma completo



**Figura 2. Protocolo de análisis para el procesamiento de los datos obtenidos a partir de la secuenciación de ARN.** Se emplearon las aplicaciones DRAGEN en BaseSpace Sequence Hub de Illumina para cuantificar los transcritos y realizar el análisis de expresión diferencial. En la primera etapa, se alinearon lecturas FASTQ al genoma humano de referencia (hg38) utilizando un alineador consciente de empalme basado en el algoritmo de Smith-Waterman, en DRAGEN RNA v.4.3.7. Se realizaron controles de calidad, marcaje de duplicados, trimming y filtrado de ARN ribosomal. La estimación de la abundancia de transcritos se expresó en Transcritos por millón (TPM). En la segunda etapa, se utilizó la aplicación DESeq2, en DRAGEN Differential Expression v.4.3.7 para evaluar la expresión diferencial entre el CNT00 y los tratamientos, se ajustaron los datos y se estimó el log2 fold change y p-value, a nivel de gen y transcrito. Elaboración propia con Biorender.com.

Una vez finalizada la corrida analítica y el llamado de bases, se procedió a realizar el análisis secundario de las lecturas de secuenciación (Fig. 2) utilizando las aplicaciones de Dynamic Read Analysis for GENomics (DRAGEN) v.4.3.6, de Illumina, disponibles en BaseSpace Sequence Hub (<https://basespace.illumina.com/apps>).

En la primera etapa del análisis se utilizó dentro de la plataforma la aplicación DRAGEN RNA v. 4.3.7 (<https://basespace.illumina.com/apps/17046029/DRAGEN-RNA?preferredversion=>) para realizar la cuantificación de los transcritos obtenidos mediante la secuenciación. Para ello se cargaron los archivos FASTQ con las lecturas del grupo control y los tratamientos generados por el secuenciador, además se seleccionó el archivo FASTA del genoma humano de referencia hg38 v.14 (/hg38-alt\_masked.cnv.hla.methylation\_combined.rna\_v4.tar.gz) y un archivo de anotación GTF/GFF del genoma humano, con la descripción de los genes, transcritos y algunas otras anotaciones genómicas. El archivo de referencia del genoma humano y el archivo de anotación se encontraban disponibles dentro de la plataforma de BaseSpace Sequence Hub, de Illumina.

Se realizó un control de calidad y un preprocesamiento inicial de los datos utilizando la plataforma Illumina DRAGEN Bio-IT (v4.1, documento #200034077 v00). En este proceso, se empleó FastQC para evaluar la calidad de las lecturas. Además, se estimó el contenido de GC para identificar posibles sesgos en la secuenciación. Se marcaron las lecturas duplicadas (Duplicate marking), que pueden corresponder a duplicados generados por PCR, y se realizó un recorte PolyA o trimming, que elimina las colas poli-A de los transcritos de ARNm para mejorar la alineación. Asimismo, se filtraron las lecturas que pudieran provenir de ARN ribosomal. Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y correlación para verificar la reproducibilidad entre las réplicas del grupo control sin tratamiento y las réplicas de los grupos de tratamiento.

DRAGEN RNA utiliza un alineador consiente de empalme o Splice-aware aligner basado en un enfoque de alineación local mediante el algoritmo de Smith-Waterman, para identificar y alinear las lecturas. El algoritmo busca la mejor coincidencia posible, pero considera que pueden existir pequeñas variaciones o inserciones/delecciones debido a procesos propios de los ARNm como el splicing o la remoción de los intrones, por lo tanto, es un algoritmo que se prefiere cuando solo una parte de la secuencia coincide con el genoma de referencia (Alser et al., 2021). Se obtienen las lecturas alineadas al genoma de referencia tanto a nivel de gen como de transcrito. Además, se realiza la anotación de los genes y transcritos con base en el archivo de anotación de referencia GTF/GFF.

Por último, DRAGEN RNA realiza la cuantificación de los transcritos mediante la medida de transcritos por millón (TPM), lo que permite comparar la expresión de cada transcrito entre las diferentes condiciones genotóxicas, en las tres réplicas biológicas realizadas.

En la segunda etapa del análisis se realiza un análisis de expresión diferencial en la plataforma BaseSpace Sequence Hub, con la aplicación DRAGEN Differential expression v.4.3.7 (<https://basespace.illumina.com/apps/17098081/DRAGEN-Differential-Expression?preferredversion=>). Para esto se cargaron los archivos de cuantificación (.quant.sf) obtenidos con la aplicación DRAGEN RNA, utilizada en los pasos previos del análisis. La expresión diferencial se realizó para cada condición genotóxica y contra el grupo control sin tratamiento.

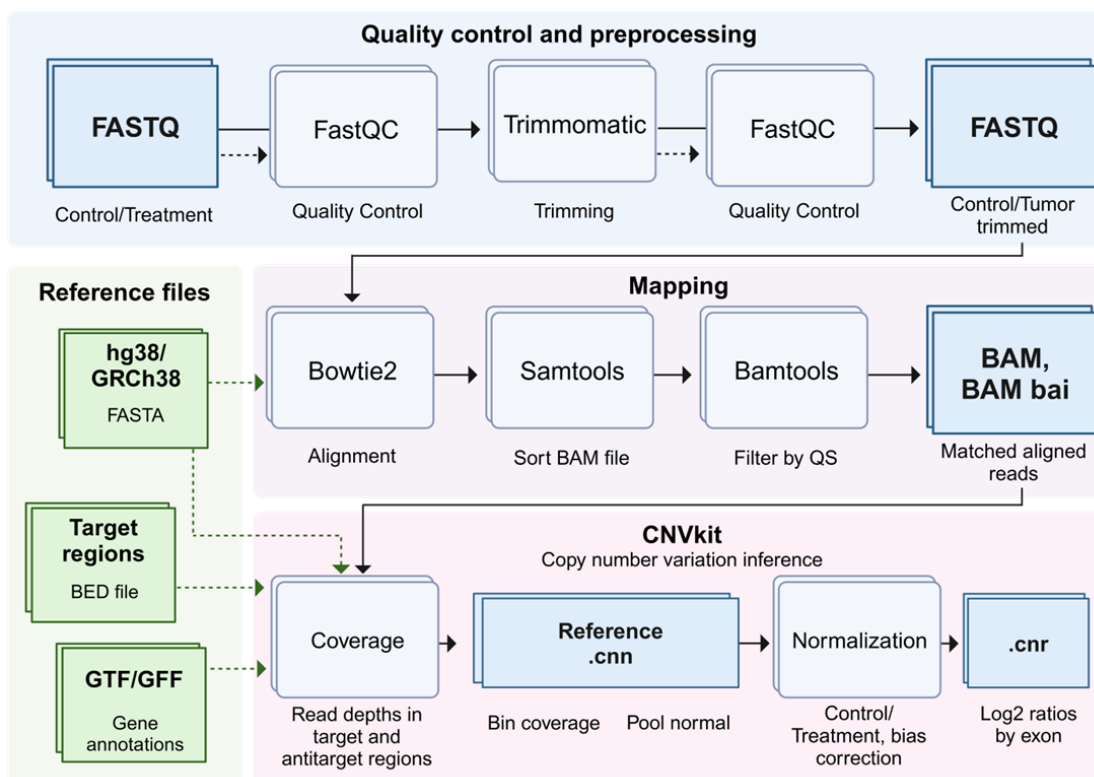
La aplicación DRAGEN Differential expression realiza un preprocesamiento de los datos de cuantificación y filtra los transcritos con muy pocas lecturas, con el fin de eliminar el ruido de fondo que puedan ocasionar transcritos con poca cobertura. Además, realiza una normalización de los datos para corregir algunas diferencias técnicas. Posteriormente, utiliza Tximport, para convertir los datos de cuantificación filtrados de TPM a una matriz adecuada

para el análisis estadístico y facilitar la compatibilidad de los datos con otras herramientas como DESeq2.

Finalmente, DRAGEN Differential expression utiliza DESeq2 como herramienta y paquete estadístico para realizar el análisis de expresión diferencial y permite comparar el grupo control sin tratamiento contra cada condición genotóxica. DESeq2 utiliza métodos de reducción para estimar la dispersión y los cambios en la expresión, como log<sub>2</sub> fold change y p-val (Love et al., 2014).

#### **4. 2. 3. 2      Secuenciación del exoma completo.**

Una vez finalizada la corrida analítica y el llamado de bases, se procedió a realizar el análisis secundario de las lecturas de secuenciación (Fig. 3) utilizando diferentes aplicaciones dentro de la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).



**Figura 3. Protocolo de análisis para el procesamiento de los datos obtenidos a partir de la secuenciación del exoma completo.** Se realizó el procesamiento y el control de calidad (FastQC) de los archivos FASTQ, la eliminación de adaptadores y bases de baja calidad (Trimmomatic). Las lecturas se mapearon al genoma de referencia hg38 utilizando Bowtie2, y los BAM generados fueron filtrados (Samtools, Bamtools) y utilizados en el conteo de lecturas con FeatureCounts. Para detectar variaciones en el número de copias (CNV), se empleó CNVkit en DNAnexus, generando un panel normal del control sin tratamiento. Los resultados se expresaron como log2 ratio en archivos .cnr, lo que identifica las regiones con CNV en comparación al control. Elaboración propia con Biorender.com.

Inicialmente se cargaron a la plataforma Galaxy los archivos crudos de secuenciación, FASTQ y se realizó el control de calidad de las lecturas, para lo cual se utilizó FastQC v.0.12.1 (S. Andrews, n.d.). Las últimas bases secuenciadas tenían una baja calidad, por lo que se utilizó Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al., 2014) para eliminar los adaptadores y para remover las bases con un Q menor a 30. Seguidamente se realizó nuevamente un

control de calidad con FastQC para asegurar la remoción de los adaptadores y de las bases de baja calidad.

A partir de los FASTQ procesados, se realizó el mapeo al genoma de referencia, genoma de referencia hg38/GRCh38 versión Dec. 2013 (hg38.fa.gz, obtenido de UCSC Genome Browser, <https://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenpath/hg38/bigZips/>), utilizando el alineador Bowtie v.2.5.3 (Langmead et al., 2009; Langmead & Salzberg, 2012). Además, con Samtools v.1.20 (Danecek et al., 2021) se ordenó el alineamiento después del mapeo al genoma y con Bamtools v.2.5.2 (Barnett et al., 2011) se realizó el filtrado complejo de los archivos BAM utilizando un filtro de calidad de mapeo con un puntaje de Phred mayor o igual a 20. Finalmente, se obtuvieron los archivos BAM y los BAM indexados (BAM.bai) para cada una de las muestras secuenciadas. Se utilizó FeatureCounts (Liao et al., 2014) para contar las lecturas de secuenciación y asegurar que las secuencias estén correctamente mapeadas.

Seguidamente, se realizó la estimación de la variación en el número de copias en la aplicación CNVkit v.2.0.1 (Talevich et al., 2016) (<https://cnvkit.readthedocs.io/en/stable/index.html>), dentro de la plataforma DNAnexus (<https://www.dnanexus.com/>). Para esto se cargaron los archivos BAM mapeados al genoma de referencia, el archivo FASTA del genoma de referencia hg38/GRCh38 versión Dec. 2013 (obtenido de UCSC Genome Browser, <https://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenpath/hg38/bigZips/>), el BED file obtenido del proveedor del Kit de preparación de la librería genética (Twist for Illumina Exome 2.0 Plus BED File (hg38); Illumina, <https://support.illumina.com/downloads/enrichment-bed-files-hg38.html>) y el archivo de anotación GTF versión 38 (Ensembl 104) obtenido de GENCODE ([https://www.encodegenes.org/human/release\\_38.html](https://www.encodegenes.org/human/release_38.html)).

CNVkit calcula la profundidad de las lecturas tanto en las regiones target como en las regiones anti-target. A partir de esto, calcula la cobertura de las regiones target y genera el archivo .cnn, que contiene los datos de cobertura y otras estadísticas asociadas de un pool de muestras normales. Para esta investigación, el panel normal se realizó con la muestra del control sin tratamiento. Este panel normal contiene la información sobre las alteraciones previas de la línea celular de cáncer de mama, antes del tratamiento genotóxico (Talevich et al., 2016).

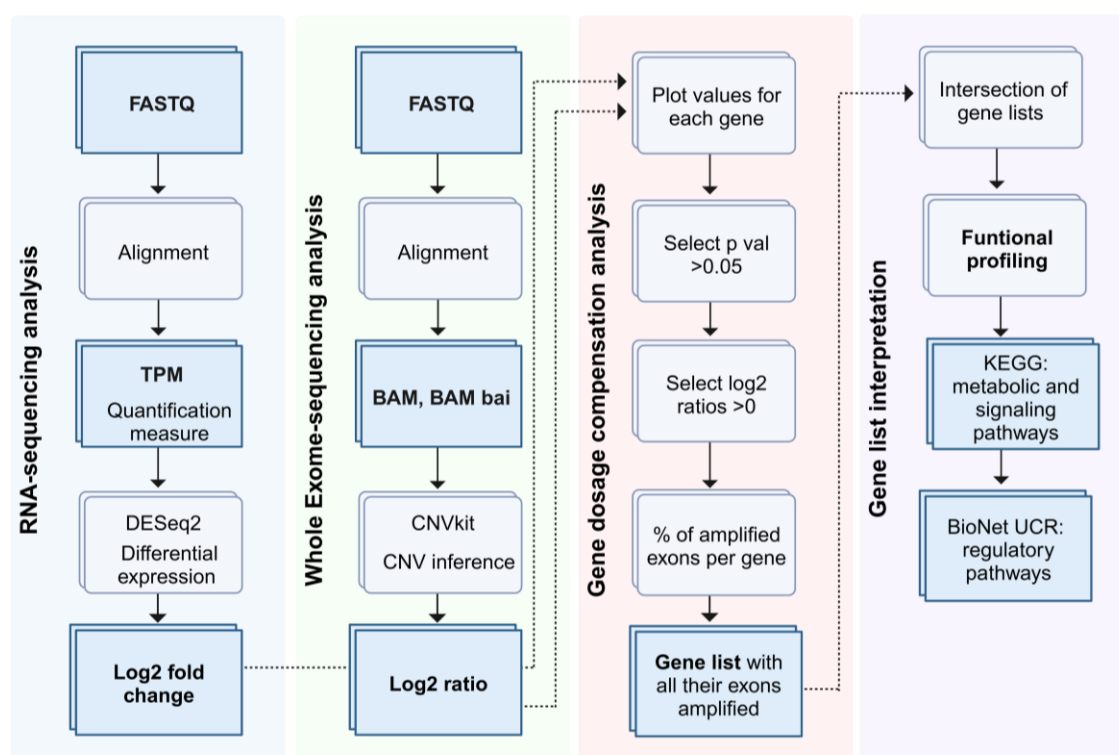
El archivo de referencia .cnn permite comparar las muestras tumorales contra el control y detectar las variaciones en el número de copias. Además, se realiza una normalización y corrección de sesgos asociados a las lecturas de las muestras tumorales. Finalmente, se obtiene el archivo .cnr, que contiene el log<sub>2</sub> ratio, el cual es la comparación de la cobertura de cada una de las muestras tratadas con respecto a la muestra control (del panel de muestras normales). Este valor permite identificar las regiones del genoma que presentaron variaciones en el número de copias en comparación con el control sin tratamiento (Talevich et al., 2016).

#### **4. 3 Análisis de compensación de dosis génica**

A partir del análisis bioinformático para la secuenciación de ARN y la secuenciación del exoma completo, se realizó un análisis para identificar los genes que podrían ser candidatos de compensación de dosis génica y posteriormente se realizó un perfil funcional a nivel de vías metabólicas y factores reguladores dentro de la lista de genes candidatos de compensación (Fig. 4).

El análisis de compensación de dosis génica se realizó en el programa MATLAB v.R2023b y se utilizó como entrada los valores del **log<sub>2</sub> fold change** y el **p-value** obtenidos a partir de la secuenciación de ARN, a nivel de gen y el **log<sub>2</sub> ratio** obtenido de la secuenciación del exoma, a nivel de exón.

Seguidamente, el script seleccionó los genes con un p-value mayor a 0.05, es decir, los genes cuya variación en la expresión no cambió de forma estadísticamente significativa con respecto al control sin tratamiento. Después se seleccionaron los exones cuyos log2 ratio fueran mayores a 0, es decir, los exones que aumentaron la relación del número de copias, respecto al control sin tratamiento.



**Figura 4. Análisis bioinformático para la identificación de los genes candidatos de compensación génica y su perfil funcional.** Se integraron los datos de secuenciación de ARN y exoma para seleccionar con los genes sin cambios estadísticamente significativos en la expresión transcripcional ( $p\text{-value} > 0.05$ ) y con la totalidad de sus exones amplificados ( $\log_2 \text{ratio} > 0$ ). A partir de cada una de las listas de genes, se realizó una intersección de los genes en común para cada tratamiento y se analizó a nivel de vías metabólicas (KEGG) y vías de regulación con factores de transcripción y microARNs (BioNet UCR). Las redes biológicas se visualizaron en Cytoscape v. 3.10.3 con los complementos de ClueGO y CluePedia. Elaboración propia con Biorender.com.

Se generaron gráficos de dispersión para observar el comportamiento entre el p-value, log2 fold change y el log2 ratio. Además, se marcaron los genes con un p-value mayor a 0.05. También se generó un histograma para observar el porcentaje de exones amplificados para cada gen. Finalmente, se obtuvo la lista de genes que tuvieron el 100% de sus exones amplificados y cuya expresión transcripcional no cambió respecto al control.

Para realizar el perfil funcional de la lista de genes, se realizó una intersección entre los genes en común obtenidos para CPT06 y CPT08 y los genes en común obtenidos para ETO04 y ETO06, es decir, se extrajo una lista de genes candidatos de compensación comunes en CPT y ETO.

#### **4. 4 Perfil funcional**

##### **4. 4. 1 Análisis de Enriquecimiento de Vías Metabólicas**

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional a nivel de vías metabólicas y de señalización utilizando los complementos ClueGO v2.5.10 (Bindea et al., 2009) y CluePedia (Bindea et al., 2013) de Cytoscape v. 3.10.3 (Shannon et al., 2003) (<https://cytoscape.org/>) para identificar y visualizar las vías metabólicas o de señalización enriquecidas funcionalmente, junto con sus respectivas definiciones.

El análisis se centró en las vías metabólicas y de señalización asociadas a los genes de interés, utilizando la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) (actualizada al 25 de mayo, 2022).

Para cada lista de genes, utilizando la nomenclatura estándar de SymbolID para la identificación de genes y se realizó un análisis de enriquecimiento utilizando la prueba hipergeométrica bidireccional. Además, se aplicó una corrección de *p-value* por Bonferroni con un umbral de significancia de 0.05. Los genes funcionalmente anotados fueron agrupados en clústeres mediante el índice de similitud *Kappa Score*, con un umbral

de solapamiento del 50% entre los términos y utilizando un análisis de agrupación jerárquica. Finalmente, se seleccionaron únicamente las vías metabólicas significativas ( $p$ -value <0.05) tras realizar una corrección por comparaciones múltiples.

#### **4.4.2 Análisis de vías de regulación**

Por otro lado, utilizando la plataforma de BioNet UCR v.2.0.1 (M. S. Acón et al., 2021) se extrajeron la lista de TFs y MIRs que se encuentran dentro de la lista de genes candidatos de compensación o bien que regulan muchos de los genes que se encuentran en la lista. Por lo que se utilizaron los comandos de *Add forward* para extraer de la lista de genes, los genes reguladores y *Back forward* para comparar los genes de la lista con una base de datos de los genes que podrían estar regulando los genes de la lista. Además, los comandos de *Delete sink nodes* para eliminar los genes que no regulan ningún otro gen o no participación en ninguna red de regulación y *Delete source nodes* para eliminar los genes que no son regulados por ningún otro gen. Con la herramienta de Cytoscape (Shannon et al., 2003) v. 3.10.3 se visualizaron las redes de regulación obtenidos mediante BioNet UCR v.2.0.1 tanto con los TFs como los MIRs.

#### **4.5 Infraestructura y equipo**

La ejecución de los experimentos de la presente Tesis de maestría se llevó a cabo en diversos laboratorios de la Universidad de Costa Rica (UCR).

El cultivo celular y el tratamiento con quimioterapia genotóxica se realizaron en el Laboratorio de Quimiosensibilidad Tumoral (LQT) de la Facultad de Microbiología (FMic).

La tinción automatizada y la captura de imágenes de los cariotipos celulares en el Laboratorio del Departamento de Análisis Clínicos (DAC) de la FMic.

La estimación de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, así como la secuenciación del transcriptoma y del exoma completo con el secuenciador NextSeq 550 de Illumina, se realizaron en el Centro de Investigación en Cirugía y Cáncer (CICICA).

El Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la UCR brindó el apoyo administrativo al proyecto de investigación C1468, en el que se enmarca esta tesis.

#### **4. 6 Colaboraciones**

El código para el análisis del Índice de Heterogeneidad normalizado y el análisis bioinformático de compensación de dosis génica se realizó en colaboración con el Dr. Rodrigo Mora. La secuenciación del transcriptoma y exoma completo se realizó en colaboración con el Dr. Ricardo Chinchilla. El análisis bioinformático del transcriptoma completo se realizó con la guía y consejería del Dr. Ricardo Chinchilla. El análisis bioinformático del exoma completo se realizó con la guía y consejería del Dr. José Guevara.

#### **4. 7 Fuentes de financiamiento**

El proyecto de investigación de la presente Tesis de maestría fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, como parte del proyecto de grupos de investigación C1468 “Papel de la compensación de dosis génica en la evolución clonal de células cancerosas inducida por dosis sub-letales de quimioterapéuticos genotóxicos” y el Fondo de Apoyo a Tesis de Posgrado, de la misma Vicerrectoría.

## **CAPÍTULO 5. RESULTADOS**

### **5. 1. Evaluación del Modelo de inestabilidad genómica acelerada**

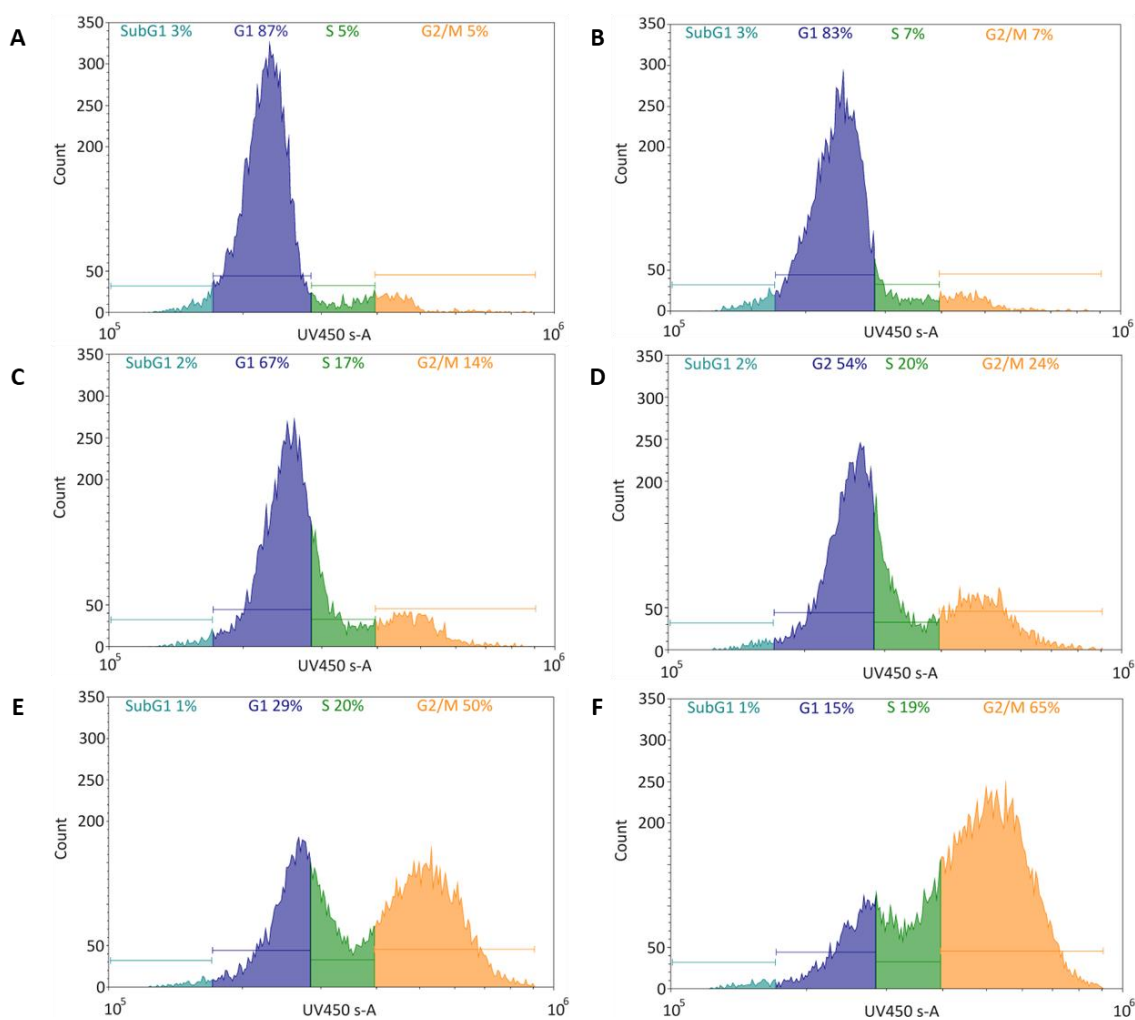
Se estandarizó un modelo de inestabilidad genómica acelerada mediante el tratamiento con dosis subletales de quimioterapia genotóxica en una línea celular de cáncer de mama, con el objetivo de identificar las dosis subletales capaces de inducir el mayor daño al ADN. La evaluación del modelo incluyó la estimación de las fases del ciclo celular y la descripción de las alteraciones estructurales en el cariotipo celular.

#### **5. 3. 1. Estimación de las fases del ciclo celular**

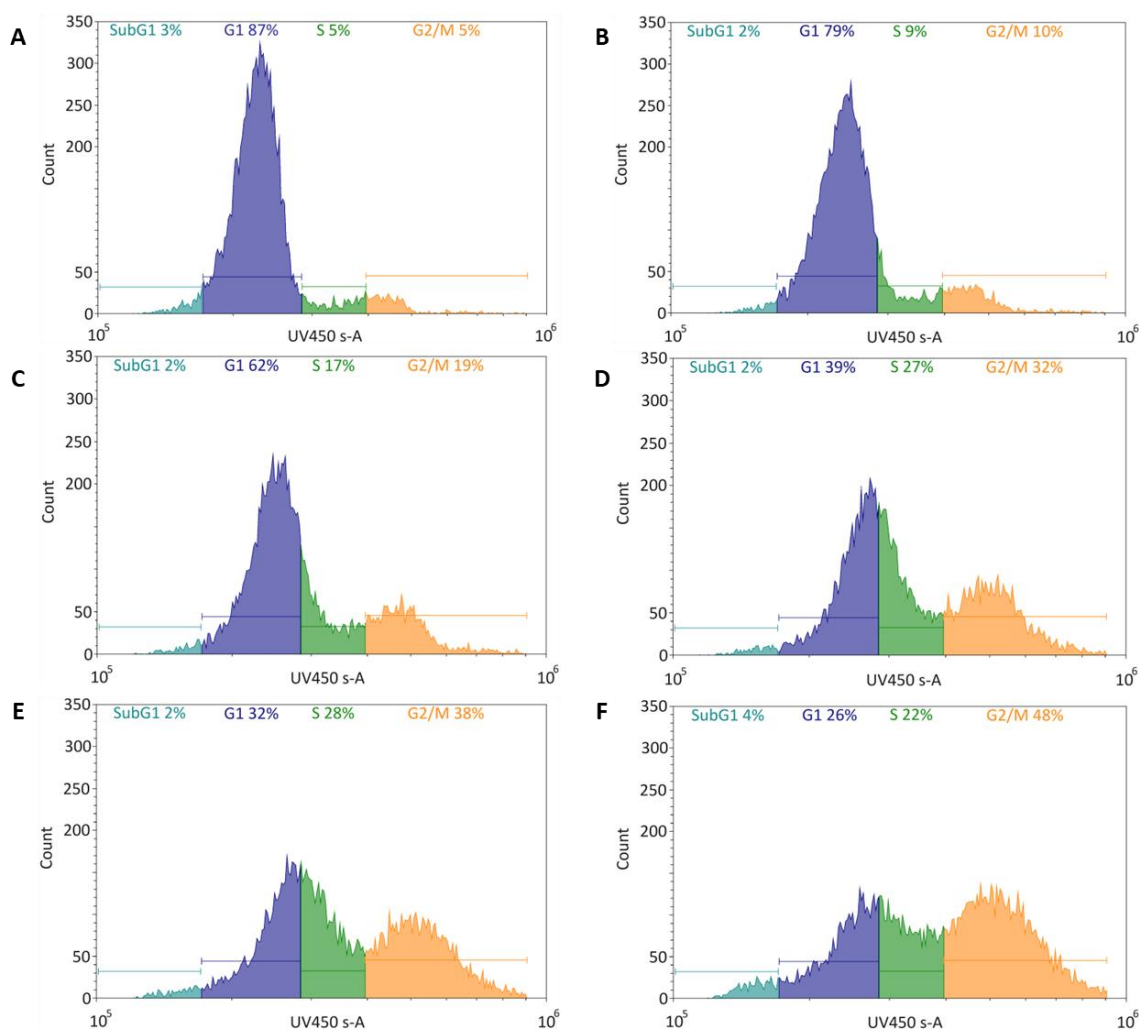
Para estimar los cambios en las fases del ciclo celular inducidos por el tratamiento con quimioterapias genotóxicas, se cuantificó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizó Hoechst 33342, un marcador fluorescente específico para regiones ricas en AT del ADN, y el software CytExpert (Beckman Coulter) para analizar las fases del ciclo celular.

La estimación de las fases del ciclo celular en cada tratamiento permitió evaluar, de forma preliminar, los cambios en el contenido de ADN. Esto se debe a que, al progresar en el ciclo celular, el contenido de ADN aumenta como resultado de la duplicación del material genético, que inicia en la fase S y culmina en la fase G2/M, donde el ADN está completamente duplicado. Así mismo, un aumento en las fases S y G2/M puede significar una detección del ciclo celular en respuesta al daño genotóxico.

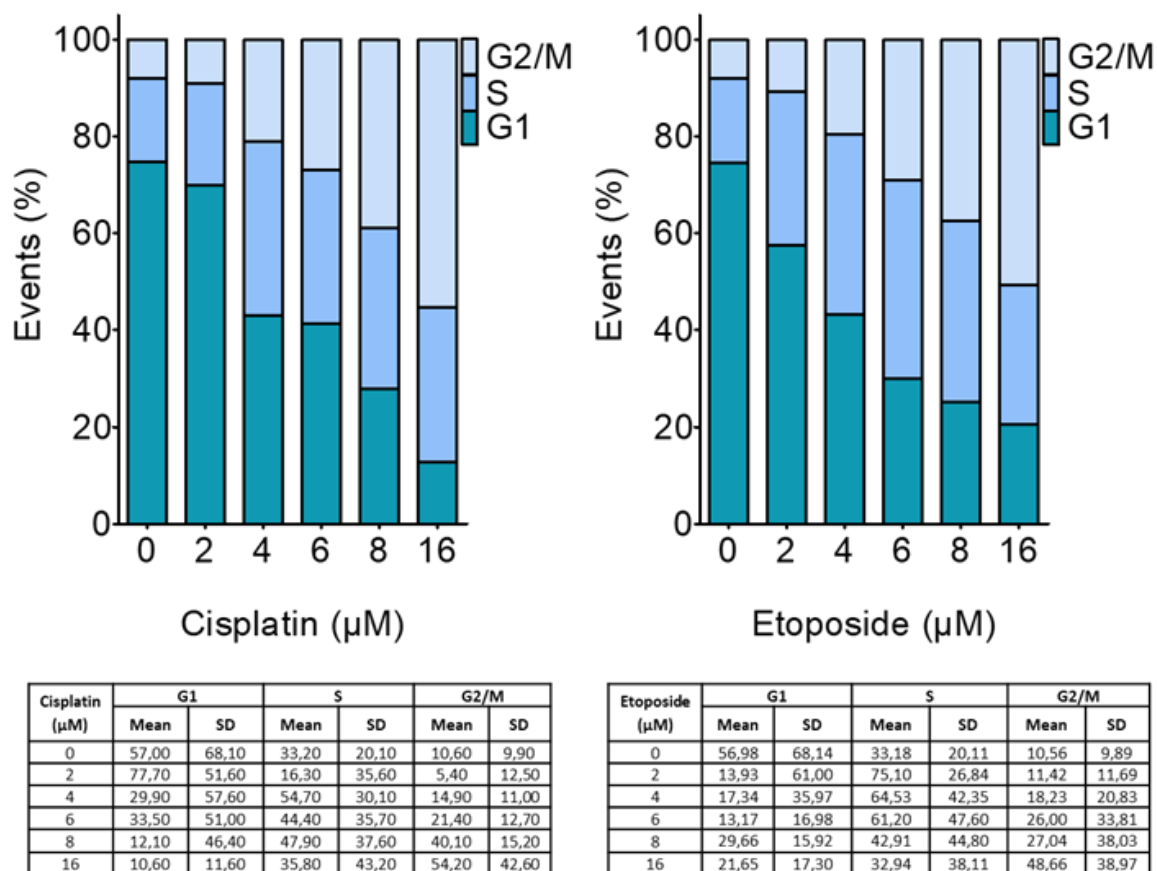
Se identificaron manualmente las fases subG1, G1, S y G2/M en el control sin tratamiento (CNT00  $\mu$ M) y se extrapolaron a cada una de las condiciones genotóxicas. Esto permitió determinar las fases del ciclo celular en los tratamientos quimioterapéuticos, utilizando como referencia el ciclo celular de las células no tratadas.



**Figura 5. Cambios en las fases del ciclo celular inducido por el tratamiento con CPT en las células HS-578T de cáncer de mama.** Las células HS-578T fueron tratadas con CPT a concentraciones crecientes de 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E) y 16 (F)  $\mu$ M y se compararon con un CNT00  $\mu$ M (A). El análisis del ciclo celular muestra una disminución gradual de la población en la fase G1 (de 87% en CNT00 a 15% con 16  $\mu$ M de CPT), acompañada por un aumento en las fases S (de 5% a 19%) y G2/M (de 5% a 65%). La proporción de células en SubG1 (1–3%) permanece constante en todas las condiciones, lo que indica que el CPT en dosis subletales indujo predominantemente una respuesta citostática, sin un aumento significativo de apoptosis. Los datos corresponden a una réplica representativa de un total de 4 réplicas independientes. Elaboración propia con CytExpert (Beckman Coulter).



**Figura 6. Cambios en las fases del ciclo celular inducido por el tratamiento con ETO en las células HS-578T de cáncer de mama.** Las células HS-578T fueron tratadas con ETO a concentraciones crecientes de 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E) y 16 (F)  $\mu\text{M}$  y se compararon con un CNT00  $\mu\text{M}$  (A). El análisis del ciclo celular, evaluado mediante tinción con Hoechst 33342, muestra una disminución progresiva de la población en la fase G1 (de 87% en el control a 26% con 16  $\mu\text{M}$  de ETO), acompañada por un aumento en las fases S (de 5% a 28%) y G2/M (de 5% a 48%). La proporción de células en SubG1 (1–4%) permanece constante en todas las condiciones, lo que indica que el CPT en dosis subletales indujo predominantemente una respuesta citostática, sin un aumento significativo de apoptosis. Los datos corresponden a una réplica representativa de un total de 4 réplicas independientes. Elaboración propia con CytExpert (Beckman Coulter).



**Figura 7. Cambios en las fases del ciclo celular en células de cáncer de mama, HS-578T inducidos por tratamiento con quimioterapia genotóxica.** Las células HS-578T fueron tratadas con concentraciones crecientes de CPT o ETO. Ambas terapias indujeron una disminución gradual de la población celular en la fase G1 y un incremento en las fases S y G2/M. Este comportamiento sugiere un arresto del ciclo celular en S y en G2/M en respuesta al daño genotóxico. Los datos representan el promedio de 4 réplicas independientes, en las tablas se presentan el promedio y la desviación estándar de cada una de las barras. Elaboración propia en Prism 5 v.5.03 (GraphPad Software).

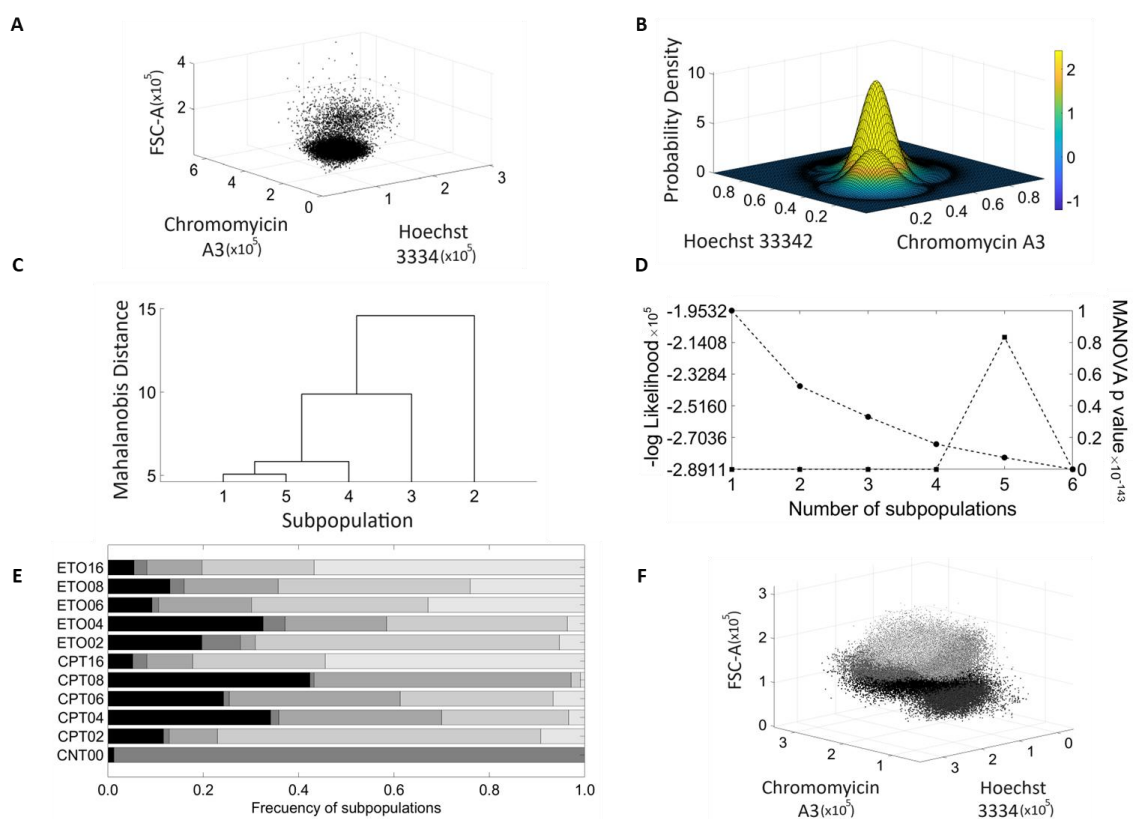
El tratamiento de las células HS-578T con CPT y ETO a concentraciones crecientes mostró resultados similares en las fases del ciclo celular (Fig. 7). En ambos casos, se observó una disminución progresiva de la población celular en la fase G1, pasando de

aproximadamente un 80% en CNT a 15% (CPT) y 20% (ETO) con la dosis más alta (16  $\mu$ M), en promedio para las 4 réplicas independientes. Al mismo tiempo, hubo un aumento en las fases S y G2/M, con un incremento notable de las células en G2/M (aproximadamente, 45% con 16  $\mu$ M de CP y ETO), lo que sugiere una acumulación celular en estas fases. Estos cambios son indicativos de un posible arresto celular en fase S y en G2/M en respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

En ambos tratamientos, la proporción de células en la fase SubG1 (1-4%) permaneció constante, lo que sugiere que el CPT y el ETO, en las dosis y tiempos analizados, indujeron predominantemente una respuesta citostática sin un aumento significativo de apoptosis.

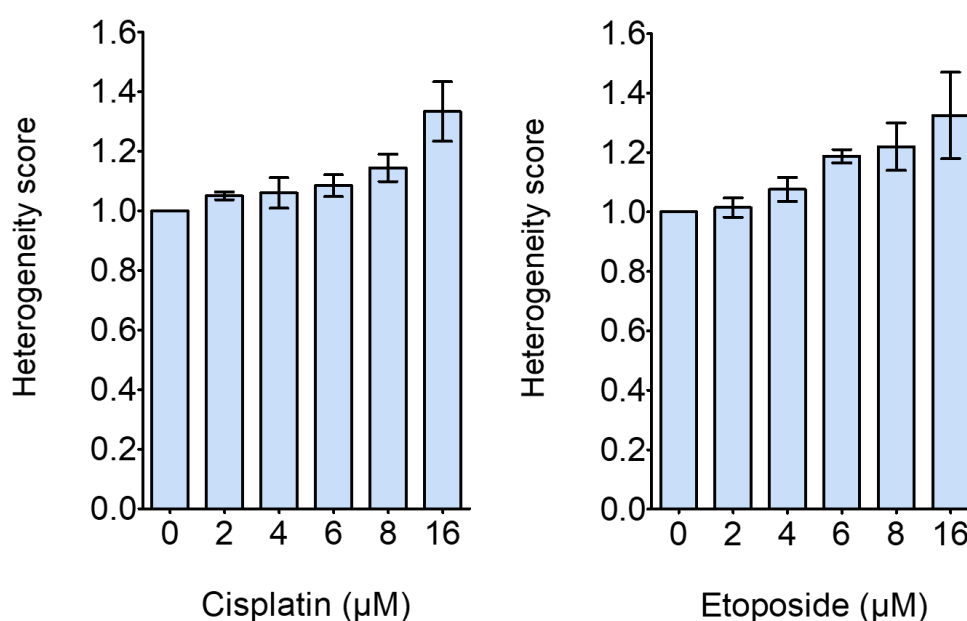
Posteriormente, para analizar el efecto de los tratamientos en la generación de subpoblaciones celulares, se calculó el Índice de Heterogeneidad Normalizado (IHn). Para esto, se generó un modelo probabilístico de mezclas de gaussianas a partir de variables derivadas de la tinción diferencial del contenido de ADN con Chromomycin A3 (unión preferencial a regiones ricas en GC) y Hoechst 33342 (unión preferencial a regiones ricas en AT) (Fig. 8).

El IHn se definió como el promedio de las covarianzas ponderadas por la frecuencia de aparición de cada subpoblación celular dentro de cada condición, utilizando las dimensiones de área y altura para los canales de fluorescencia UV450 (Hoechst 33342) y V610 (Cromomicina A3) (Fig. 8). El IHn se normalizó respecto al CNT00, por lo que un valor de IHn igual a 1 indica que no hubo cambios en la heterogeneidad celular en comparación con el control. Un aumento en el índice sugiere un cambio en las covarianzas de las intensidades de fluorescencia asociadas a las regiones AT y GC de las subpoblaciones celulares.



**Figura 8. Estimación de la heterogeneidad de la población celular post tratamiento mediante el Índice de heterogeneidad normalizado.** Se estimó el grado de heterogeneidad celular mediante tinción doble, utilizando Hoechst 33342 y Cromomicina A3. (A) Se seleccionó la población G1 y se agruparon en 2 clústeres ( $\max K=2$ ) en 4 dimensiones (área y altura de UV450-Hoechst 33342 y V610-Cromomicina A3). (B) Se calculó la densidad de la probabilidad en las 4 dimensiones. Se entrenó un modelo de mezclas Gaussianas con un máximo de 10 grupos ( $\max K=10$ ). (C) La distancia de Mahalanobis se calculó para predecir la relación entre las subpoblaciones. (D) Se calculó el  $-\log$  Likelihood y el p-valor MANOVA para medir la capacidad predictiva del modelo y su significancia estadística. (E) Se observó que la quimioterapia genotóxica induce cambios en la frecuencia de subpoblaciones celulares en la fase G1. (F) Dispersión de las subpoblaciones en las 4 dimensiones evaluadas. Elaboración propia con MATLAB v.R2023b.

Se observó que, al aumentar la concentración de la quimioterapia genotóxica, se produjo un aumento en la heterogeneidad celular. Mientras que en el CNT00 se identificaron solo dos subpoblaciones celulares, los tratamientos con quimioterapia generaron aproximadamente cinco subpoblaciones celulares, lo que refleja el impacto del daño genotóxico sobre la estructura genética de las células, y sugiere la aparición de subpoblaciones celulares (Fig. 8, F).

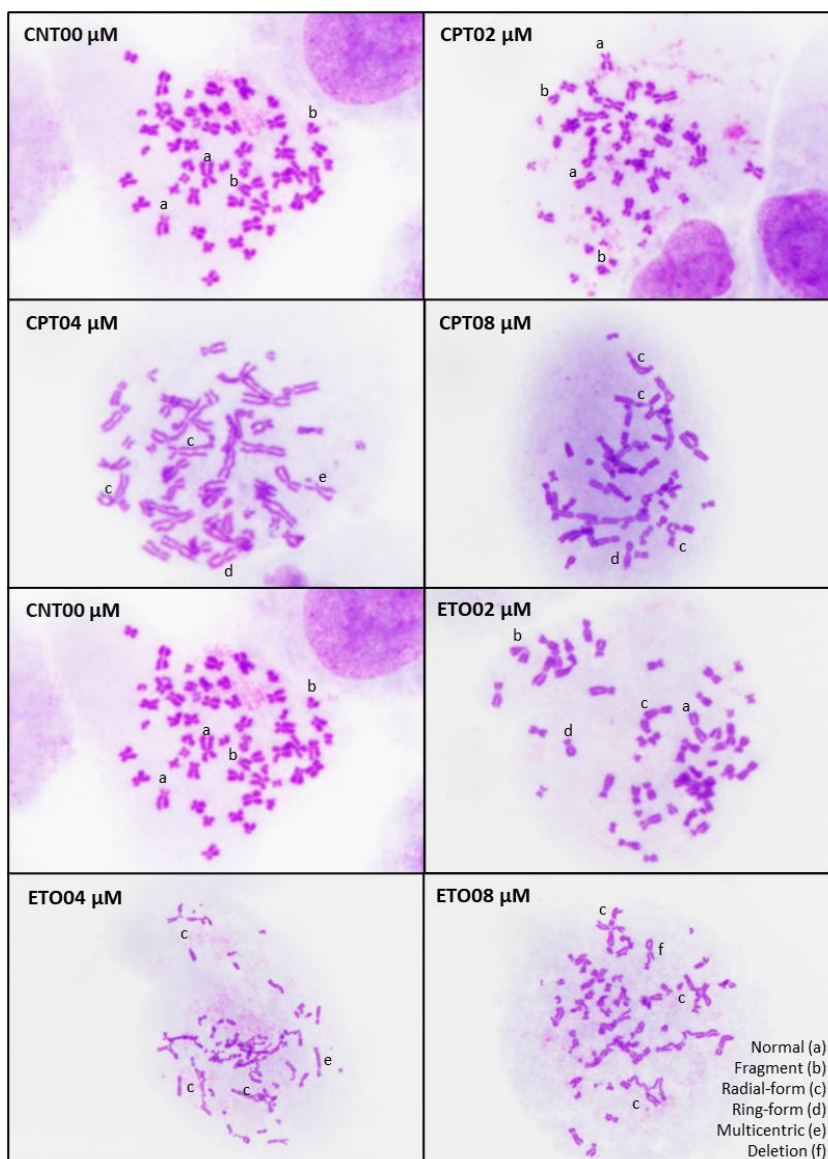


**Figura 9. Dosis crecientes de quimioterapia genotóxica inducen cambios en la heterogeneidad, en células HS-578T, evaluados mediante IHn.** Los cambios más importantes respecto al CNT se observan para CPT a concentraciones de 8 y 16 μM, y para ETO a 6, 8 y 16 μM. Los datos corresponden a 4 réplicas independientes. Elaboración propia con GraphPad Prism 5 v.5.03.

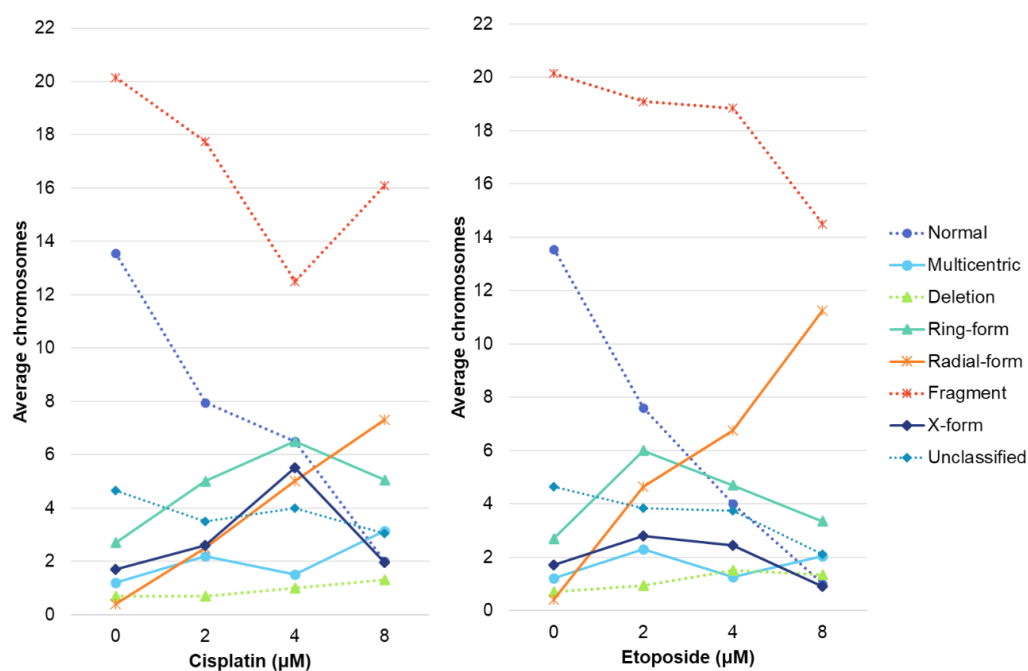
Se observa una tendencia creciente en el IHn al aumentar la concentración de CPT y ETO. El valor máximo del índice es aproximadamente 1.3, observado a la concentración de 16 μM tanto para CPT como para ETO. Sin embargo, hay cambios respecto al CNT desde 8 μM en el caso de CPT, y desde 6 μM para ETO (Fig. 9).

### **5. 3. 2. Cariotipo celular**

Como parte de la evaluación del Modelo de inestabilidad genómica acelerada, se realizó el cariotipo de las células expuestas al daño genotóxico. Para esto, las células se trataron con quimioterapia genotóxica, se arrestaron en metafase y se tiñeron con Wright para visualizar los cromosomas celulares. Se tomaron fotografías de los cariotipos y se clasificaron las alteraciones estructurales (ver Tabla 1) basado en (Savage, 1975, 1999).



**Figura 10. Dosis crecientes de quimioterapia genotóxica inducen alteraciones estructurales en los cromosomas de la línea celular HS-578T.** Tras tratar las células con quimioterapia y arrestarlas en metafase, se observó que en el CNT00  $\mu\text{M}$  predominan cromosomas normales, con algunas alteraciones como fragmentación. A concentraciones de 2  $\mu\text{M}$  de CPT y ETO, las alteraciones son similares al control, aunque para ETO aparecieron cromosomas radiales y en forma de anillo. A concentraciones de 4  $\mu\text{M}$ , las alteraciones fueron más complejas, con cromosomas radiales, en anillo y multicéntricos, siendo más complejas en ETO que en CPT. A 8  $\mu\text{M}$ , las alteraciones fueron más complejas e involucraron varios cromosomas completos o fragmentados. Cariotipos representativos de 3 réplicas independientes. Imágenes obtenidas con la cámara U-TV0.5X-3 y el microscopio de luz CX31, ambos de OLYMPUS.



**Figura 11. El tratamiento con dosis crecientes de CPT y ETO inducen una disminución en la cantidad cromosomas normales y un aumento en las alteraciones estructurales.** Después de la tinción, observación y clasificación de las alteraciones estructurales del cariotipo celular, se promedió el número de cromosomas para cada clasificación. CPT induce una disminución de los cromosomas normales y un aumento de las alteraciones estructurales, especialmente de alteraciones complejas como cromosomas radiales, multicéntricos y deleciones. Aunque ETO tiene un comportamiento similar, se observa una tendencia decreciente en el número de cromosomas normales más pronunciada y una tendencia creciente y una mayor magnitud en el número de cromosomas con alteraciones complejas como cromosomas radiales. Elaboración propia en Microsoft Excel.

La línea celular HS-578T de cáncer de mama presenta alteraciones estructurales de previo, que son evidentes en el CNT00 μM, como cromosomas fragmentados, radiales, en forma de anillo, multicéntricos y deleciones (Fig. 9).

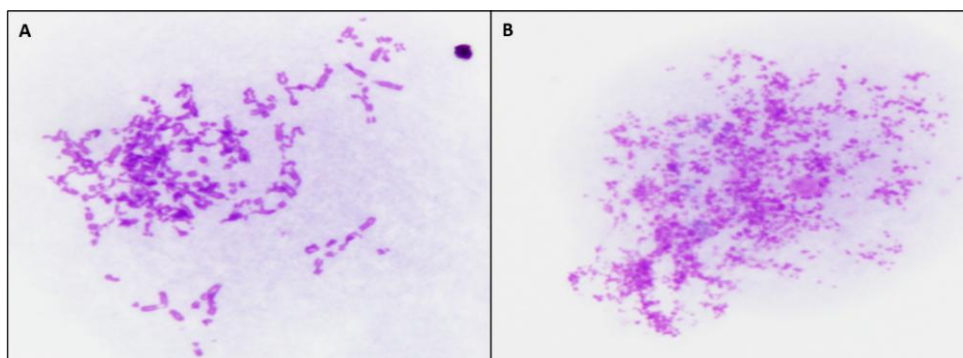
A dosis bajas 2 μM de CPT y ETO, se observan alteraciones similares al control, pero con una disminución en el número de cromosomas normales. Con el aumento de la dosis, especialmente a 4 μM y 8 μM, se incrementa la cantidad, complejidad y variedad de las

alteraciones estructurales, con cromosomas radiales, anillo, multicéntricos y deleciones, y se observan intercambios más complejos, de forma muy similar en ambos tratamientos (Fig. 10 y Fig. 11).

Se observa que la tendencia de cromosomas normales decrece de forma más pronunciada para ETO que para CPT y la aparición de alteraciones complejas aumenta desde concentraciones más bajas de ETO, 2  $\mu\text{M}$ , y tiene una mayor magnitud que para CPT a la misma dosis (Fig. 11).

En ambos tratamientos, la complejidad de las alteraciones estructurales aumenta a medida que se eleva la dosis, pero no se observa una disminución en la inestabilidad cromosómica, ya que las interacciones más complejas implican un mayor número de cromosomas. Estas dosis (4  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$ ) permiten la proliferación celular a pesar de las alteraciones estructurales observadas.

Cabe destacar que para ambos tratamientos (Fig. 11) algunas alteraciones estructurales disminuyen en dosis más altas 8  $\mu\text{M}$ , sin embargo, se observa que a esta dosis predominan las alteraciones más complejas como cromosomas radiales. La disminución de algunas de las alteraciones estructurales no sugiere una disminución en la inestabilidad cromosómica inducida por CPT, si no que, en este caso, sugiere que hay un remplazo de las alteraciones estructurales más simples por otras alteraciones de mayor complejidad y que involucran un mayor número de interacciones con otros cromosomas. Es decir, son menos número de alteraciones, pero son alteraciones más complejas, con interacciones con un mayor número de cromosomas.



**Figura 12. El tratamiento con dosis de 16  $\mu\text{M}$  de Cisplatino y Etopósido induce los fenómenos de pegajosidad y pulverización en los cromosomas celulares.** Se realizó la tinción con Wright de los cromosomas celulares arrestados en metafase, después del tratamiento 16  $\mu\text{M}$  y 32  $\mu\text{M}$  de quimioterapia genotóxica (Cisplatino y Etopósido), en la línea celular de cáncer de mama HS-578T. A dosis de 16  $\mu\text{M}$  la visualización de cariotipos celulares con cromosomas clasificables fue muy escaso y predominaron cariotipos con (A) los fenómenos de pegajosidad y (B) pulverización. Sin embargo, a dosis de 32  $\mu\text{M}$  los cromosomas celulares no se observados (datos no mostrados). Imágenes obtenidas con la cámara U-TV0.5X-3 y el microscopio de luz CX31, ambos de OLYMPUS.

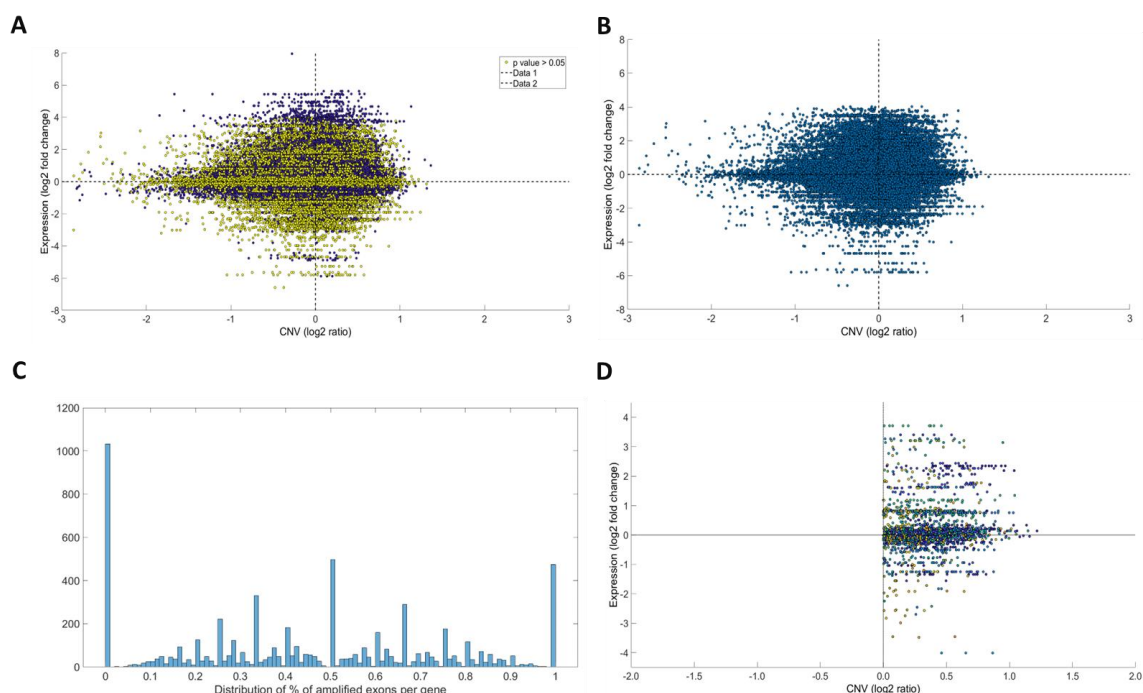
En la dosis de 16  $\mu\text{M}$  tanto para ETO como para CPT, la visualización de los cariotipos celulares con cromosomas clasificables fue casi nula, lo que dificultó realizar la clasificación y el conteo de las alteraciones estructurales para esta dosis y, por lo tanto, no se cuantificó. Sin embargo, sí se pudo observar en algunos casos, la aparición del fenómeno de pegajosidad (Fig. 12, A) y pulverización (Fig. 12, B), descrito por (Savage, 1975). Así mismo, se probó la dosis de 32  $\mu\text{M}$  y no se observaron cariotipos celulares (datos no mostrados).

La evaluación del modelo de inestabilidad permitió seleccionar las dosis de CPT y ETO que sugieren: aumento en la heterogeneidad, mayor inestabilidad cromosómica y en dosis que permiten la sobrevivencia y proliferación celular. A partir de esto se seleccionaron las dosis de 6 y 8  $\mu\text{M}$  para CPT y 4 y 6  $\mu\text{M}$  para ETO, se consideró que ETO induce un mayor daño a dosis más bajas que CPT. Cabe señalar que estos rangos de dosis de CPT y ETO permiten que las células continúen proliferando a pesar de las alteraciones estructurales y

complejas que se observan en los cariotipos celulares (previamente demostrado por Jiménez-Araya et al.; Cascante-Mora et al. Datos no publicados).

## **5. 2. Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica**

A partir de las dosis de CPT y ETO seleccionadas en el modelo de inestabilidad genómica se realizó la secuenciación del transcriptoma y el exoma completo de cada una de las condiciones.



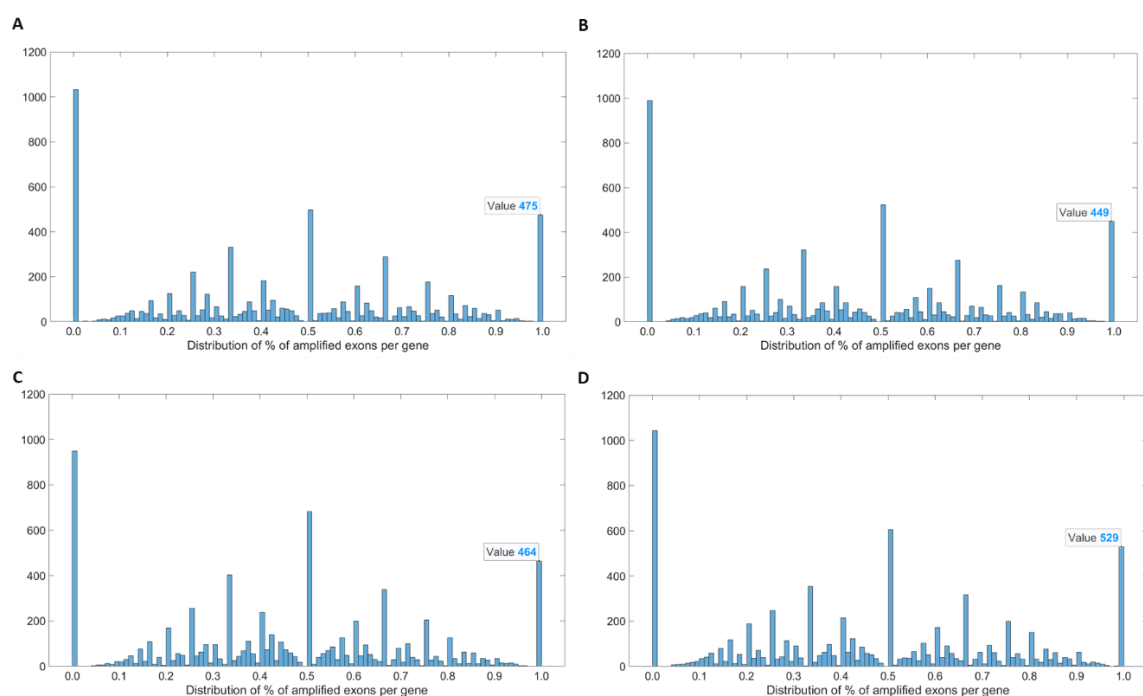
**Figura 13. Relación entre la expresión transcripcional y la variación en el número de copias (CNV) a partir de la secuenciación del transcriptoma y exoma completo.** Mediante un análisis de expresión diferencial con DESeq2 y un análisis de inferencia de CNV con CNVkit se identificó una lista de genes con todos sus exones amplificados y sin cambios estadísticamente significativo en la expresión de ARN, lo que sugiere un mecanismo de compensación de dosis génica. Se graficó la expresión (log<sub>2</sub> fold change) y CNV (log<sub>2</sub> ratio) para todos los exones, y se resaltó en mayoría los p-value >0.05 (A). Se seleccionó únicamente los genes que no tuvieron variaciones estadísticamente significativas en la expresión transcripcional y que tuvieran un aumento en el número de copias respecto al CNT00 (log<sub>2</sub> ratio) (B). Se graficó un histograma para observar la distribución del porcentaje de exones amplificados por gen y se extrajo una lista de genes candidatos de compensación (con la totalidad de sus exones amplificados) (C). Además se graficó el comportamiento de los genes con la totalidad de sus exones compensados y el nivel de expresión (D). Figura representativa de una condición genotóxica. Elaboración propia con MATLAB v.R2023b.

Se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando DESeq2 en la aplicación DRAGEN RNA de BaseSpace Hub de Illumina, donde se obtuvieron datos de expresión transcripcional, log<sub>2</sub> fold change y p-value asociado a nivel génico. Adicionalmente, se utilizó CNVkit en la plataforma DNAnexus para inferir variaciones en el número de copias

(CNV) como una relación  $\log_2$  ( $\log_2$  ratio) respecto al CNT00, a nivel de exón. A partir de estos análisis, se identificó una lista de genes que no presentaron cambios estadísticamente significativos en su expresión transcripcional, pero que mostraron un aumento en CNV en todos los exones que los componen (Fig. 13).

A partir del análisis anterior, se graficó la distribución del porcentaje de exones amplificadas por gen (Fig. 13) y se generó una lista de genes candidatos para compensación de dosis génica en cada condición genotóxica. En CPT06  $\mu\text{M}$  se identificaron 449 genes candidatos, en CPT08  $\mu\text{M}$  475, en ETO04  $\mu\text{M}$  529 y en ETO06  $\mu\text{M}$  464 (ver Anexos 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Además, del total de genes analizados (60609 genes) solo un 0.8% en promedio (CPT08 0.8%, CPT06 0.7%, ETO06 0.8% y ETO04 0.9%) presentó compensación, a nivel de todos sus exones.

Como se muestra en la Fig. 14, muchos genes presentaron cambios en el CNV respecto al CNT00; sin embargo, solo una pequeña proporción mostró un aumento en el 100% de sus exones. Esto sugiere que los tratamientos quimioterapéuticos inducen aumentos en el contenido de ADN, los cuales pueden manifestarse tanto en todos los exones que componen un gen como únicamente en algunos de ellos.



**Figura 14. Distribución del porcentaje de exones amplificados por gen en cada condición genotóxica.**

Se identificó una lista de genes candidatos de compensación de dosis génica, caracterizados por no presentar cambios estadísticamente significativos en la expresión de ARN y tener el 100% de sus exones amplificados. En CPT08  $\mu\text{M}$  (A) se identificaron 475 genes candidatos, en CPT06  $\mu\text{M}$  (B) 449, en ETO06  $\mu\text{M}$  (C) 464 y en ETO04  $\mu\text{M}$  (D) 529. Elaboración propia en MATLAB v.R2023b.

Aunque las alteraciones en exones específicos podrían tener relevancia clínica, el presente proyecto de investigación se enfocó exclusivamente en aquellos genes que presentaron aumentos en el CNV en el 100% de sus exones y que no mostraron cambios estadísticamente significativos en su expresión transcripcional.

Posteriormente, se realizó una intersección de las listas de genes identificadas en cada condición genotóxica, lo que permitió identificar para CPT 263 genes candidatos de compensación en común y para ETO 229 (ver Anexos 5 y 6, respectivamente).

### **5.3. Perfil funcional**

A partir de la lista de genes comunes identificada en las dosis seleccionadas en el modelo de inestabilidad genómica acelerada, se llevó a cabo una caracterización del perfil funcional; con el fin de identificar las vías metabólicas o de señalización y los mecanismos de regulación en los que están involucrados los genes candidatos de compensación de dosis génica (descrito en Materiales y Métodos).

#### **5.3.1. Vías metabólicas o de señalización: KEGG**

El análisis de las vías y términos asociados a los genes candidatos de compensación de dosis génica para los tratamientos con CPT y ETO se realizó con la herramienta ClueGO v2.5.10 y la base de datos de KEGG (actualizada a mayo 2022). A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada tratamiento:

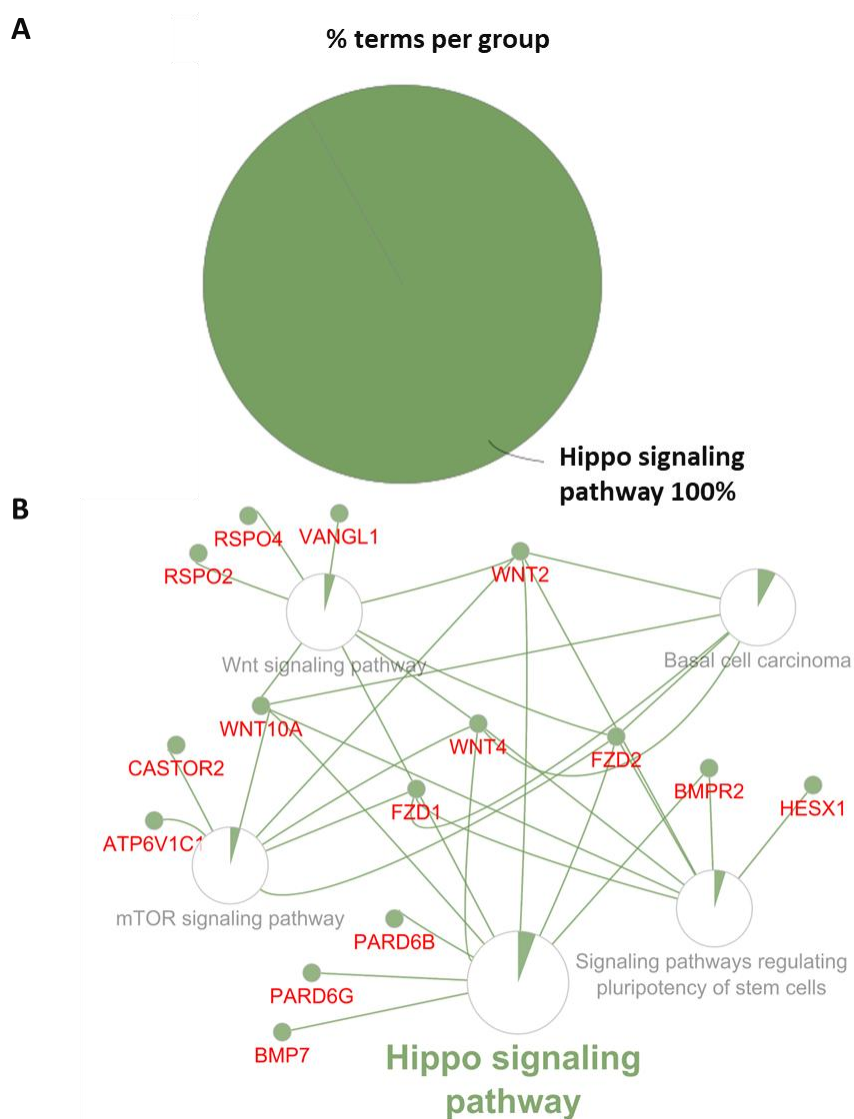
Se cargaron un total de 263 genes únicos para CPT y 229 genes únicos para ETO. De estos, 259 genes CPT y 226 genes ETO fueron reconocidos y anotados por ClueGO. Únicamente 4 genes CPT y 3 genes ETO no fueron anotados por la base de datos. De los genes reconocidos, el 40.15% de los genes CPT y el 38.5% de los genes ETO tuvieron anotaciones funcionales en la base de datos, mientras que un 59.85% de los genes de CPT y 61.5% de los genes de ETO no fueron anotados funcionalmente.

Respecto a las vías biológicas relevantes, se identificaron 2 términos representativos para CPT, con 28 genes asociados (10.81%) y tras aplicar el umbral de significancia ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) solo 15 genes (5.79%) se asociaron a 5 términos representativos.

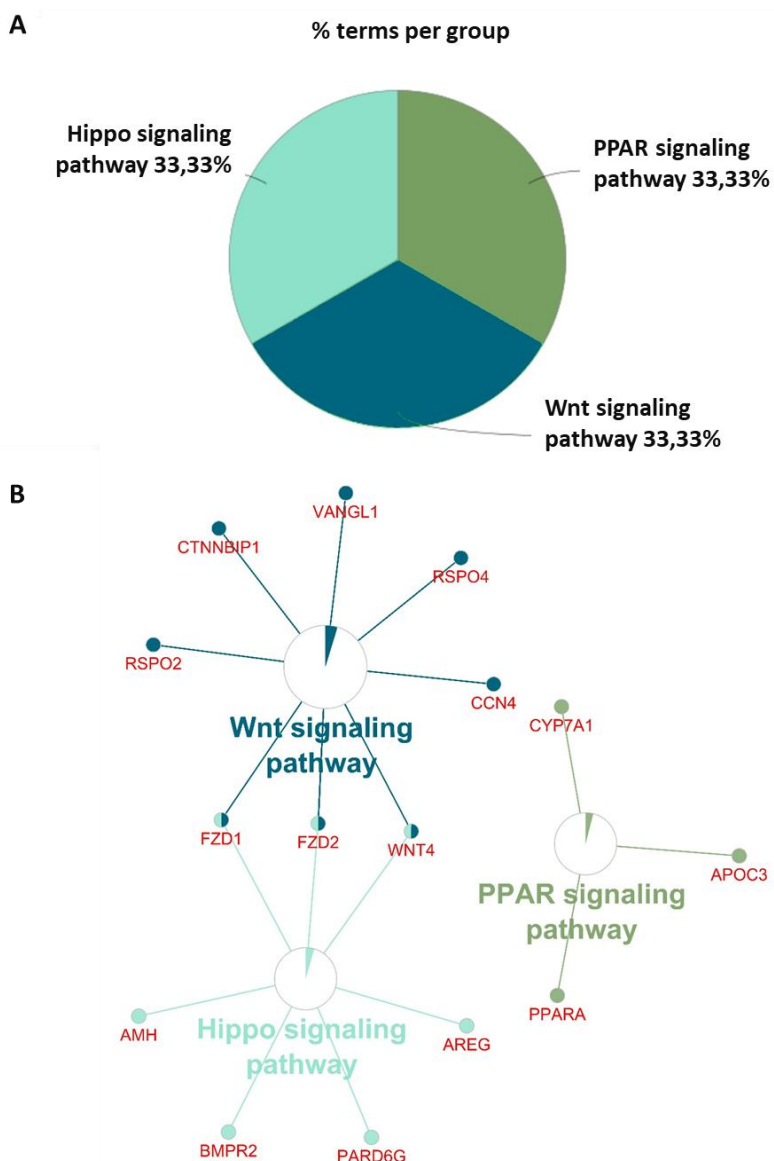
Para ETO se identificaron 8 términos representativos, con 23 genes asociados (10.18%), y tras aplicar el umbral de significancia, solo 15 genes (6.64%) se asociaron a 3 términos representativos.

En cuanto a la agrupación funcional, mediante el algoritmo de Kappa Score se identificó para CPT un único grupo con términos funcionales en común: *vía de señalización Hippo* (KEGG:04390, 100%, p-value corregido 0.00), y cuatro subgrupos con términos funcionales asociados: *vía de señalización Wnt* (KEGG:04310, p-value corregido 0.01), *vía de señalización mTOR* (KEGG:04150, p-value corregido 0.03), *regulación de las vías de señalización de células madre pluripotenciales* (KEGG:04550, p-value corregido 0.02) y *carcinoma basal celular* (KEGG:05217, p-value corregido 0.01) (Fig. 15).

Así mismo, para ETO se identificaron tres grupos con términos funcionales: *vía de señalización Hippo* (KEGG:04390, 100%, p-value corregido 0.00), *vía de señalización Wnt* (KEGG:04310, 33.33%, p-value corregido 0.00) y *vía de señalización PPAR* (KEGG:03320, 33.33%, p-value corregido 0.05) (Fig. 16).



**Figura 15. Caracterización funcional de las vías metabólicas, en términos KEGG, asociados a genes candidatos de compensación de dosis génica en un modelo de inestabilidad genómica acelerada con CPT.** (A) Se identificaron los términos KEGG enriquecidos y estadísticamente significativos ( $p$ -value corregido por Bonferroni  $< 0.05$ ) de la lista de genes candidatos. El término más destacados fue: vía de señalización Hippo (KEGG:04390, 100%,  $p$ -value corregido 0.00). (B) La red funcional representa los genes asociados al término KEGG, así como los subgrupos de los términos KEGG asociados a la vía de señalización Hippo: vía de señalización Wnt (KEGG:04310,  $p$ -value corregido 0.01), vía de señalización mTOR (KEGG:04150,  $p$ -value corregido 0.03), regulación de las vías de señalización de células madre pluripotenciales (KEGG:04550,  $p$ -value corregido 0.02) y carcinoma basal celular (KEGG:05217,  $p$ -value corregido 0.01). El gráfico de pastel en los nodos de los términos GO muestra el porcentaje de genes identificados en la lista en comparación con el total de genes asociados a cada término KEGG. Elaboración propia con ClueGO v2.5.10 en Cytoscape v3.10.3.

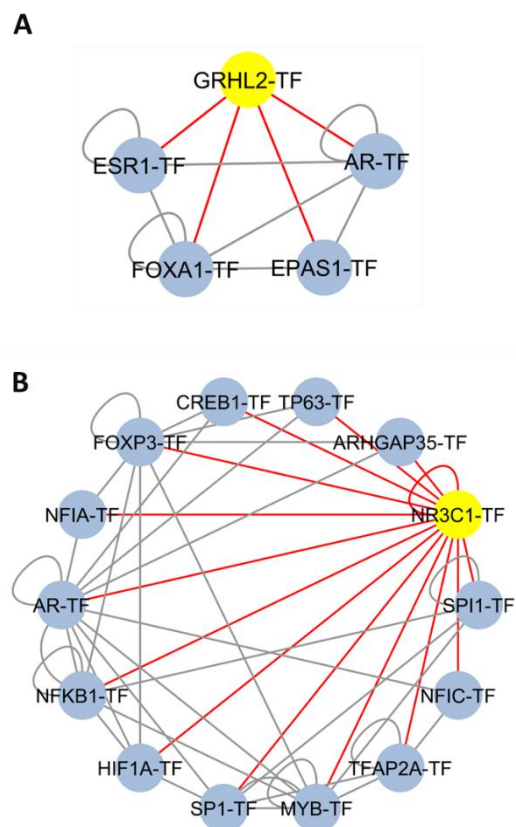


**Figura 16. Caracterización funcional de las vías metabólicas, en términos KEGG, asociados a genes candidatos de compensación de dosis génica en un modelo de inestabilidad genómica acelerada con ETO.** (A) Se identificaron los términos KEGG enriquecidos y estadísticamente significativos (p-value corregido por Bonferroni  $< 0.05$ ) de la lista de genes candidatos. Los tres términos más destacados fueron: vía de señalización Hippo (KEGG:04390, 100%, p-value corregido 0.00), vía de señalización Wnt (KEGG:04310, 33.33%, p-value corregido 0.00) y vía de señalización PPAR (KEGG:03320, 33.33%, p-value corregido 0.05). El gráfico de pastel en los nodos de los términos GO muestra el porcentaje de genes identificados en la lista en comparación con el total de genes asociados a cada término KEGG (B). Elaboración propia con ClueGO v2.5.10 en Cytoscape v3.10.3.

### 5. 3. 2. Vías de regulación a nivel de factores de transcripción

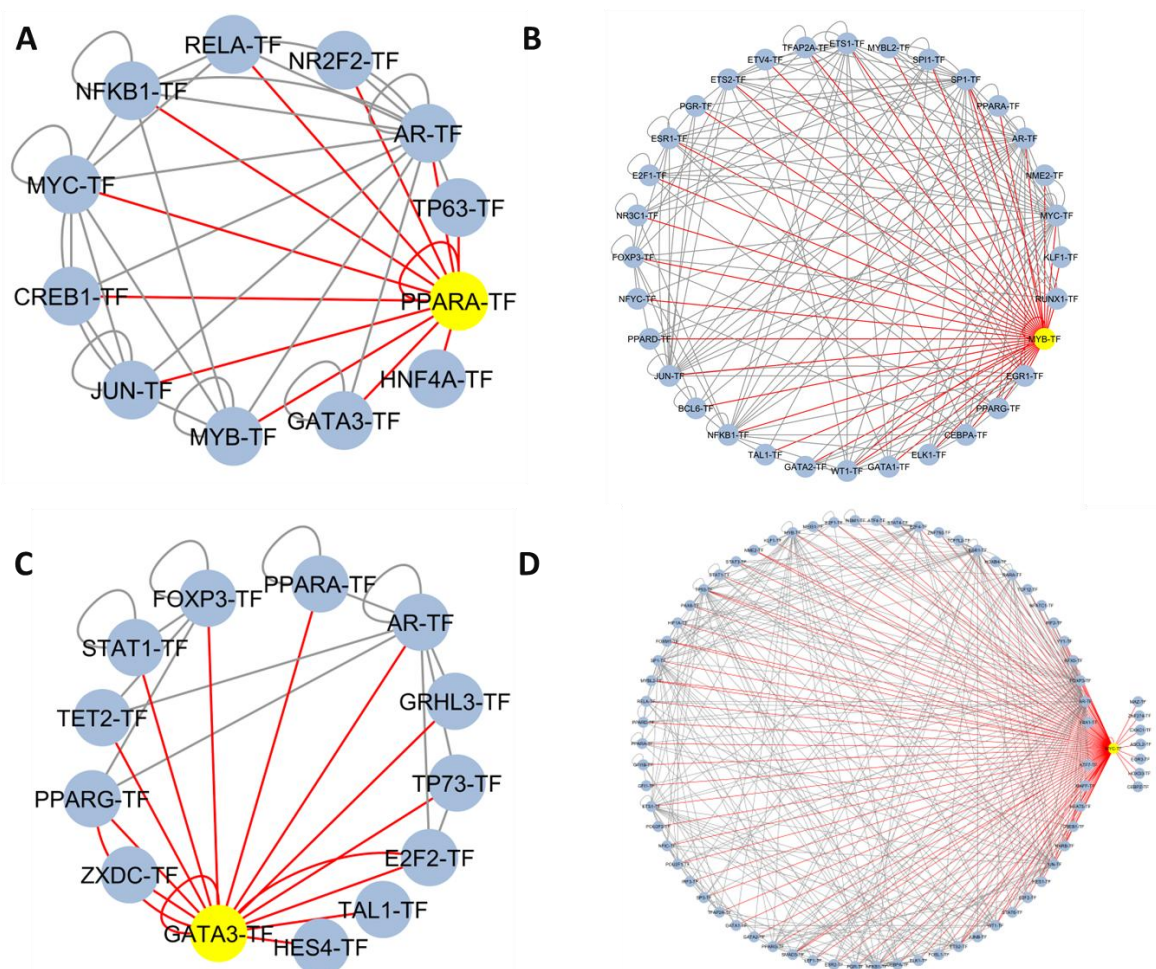
Se empleó la plataforma BioNet UCR v.2.0.1 para identificar redes regulatorias asociadas a los genes candidatos de compensación génica en el modelo de inestabilidad genómica acelerada. Estas redes incluyen factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) que regulan o son regulados por los genes de interés. Las interacciones fueron procesadas y refinadas eliminando nodos sin participación en la red mediante herramientas específicas de la plataforma, y las redes resultantes se visualizaron utilizando Cytoscape v.3.10.3.

Se visualizaron las redes de regulación completas (TF y MIRs) y las redes de regulación con únicamente los TFs que participan en la red para CPT (Fig. 19) y para ETO (Fig. 20) (ver Anexos 8 y 9, respectivamente). En CPT, se identificaron únicamente dos TFs con redes que presentan interacciones entre múltiples TFs: *Grainyhead like transcription factor 2 (GRHL2)* y *Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1)* (Fig. 17).



**Figura 17. Redes de regulación transcripcional en un modelo de inestabilidad genómica acelerada con CPT.** Se identificaron los factores de transcripción (TFs) de la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica. (A) Red de regulación transcripción de GRHL2. (B) La red de regulación de NR3C1. Elaboración propia con BioNet UCR v.2.0.1 y Cytoscape v3.10.3.

En ETO, se identificaron cuatro TFs con redes que presentan interacciones entre múltiples TFs: *peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)*, *MYB proto-oncogene, transcripción factor (MYB)*, *GATA binding protein 3 (GATA3)*, y *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (MYC)* (Fig. 18).



**Figura 18. Redes de regulación transcripcional en un modelo de inestabilidad genómica acelerada con ETO.** Se identificaron los factores de transcripción de la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica. (A) Red de regulación transcripción de PPARA, (B) MYB, (C) GATA3 y (D) MYC. Elaboración propia con BioNet UCR v.2.0.1 y Cytoscape v3.10.3.

## CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La aneuploidía es un evento ampliamente reconocido en células de cáncer, sin embargo, en células sanas tiene un rol antitumoral ya que induce daños en el ADN, senescencia, proteotoxicidad e incluso muerte celular y del organismo. Resulta sumamente complejo entender cómo las células de cáncer exhiben cariotipos sumamente inestables y aun así logran sobrevivir y proliferar. Ante esto se ha planteado la hipótesis de la compensación de dosis, que sugiere que las células de cáncer pueden modular la expresión de ciertos genes y compensar el aumento en la carga génica.

A partir de lo anterior desarrollamos la presente tesis de investigación basados en la hipótesis de que ante el daño genotóxico las células de cáncer de mama inducen fenómenos de compensación de dosis génica que contribuyen al proceso de sobrevivencia y proliferación celular. Desarrollamos la idea de que el daño genotóxico aumenta la inestabilidad genómica y la heterogeneidad celular, pero que las células pueden activar mecanismos regulatorios de compensación que les permite tolerar la inestabilidad, resistir el daño, sobrevivir y proliferar.

Esta capacidad de las células de cáncer adquiere relevancia dado que se ha documentado que mayor inestabilidad genómica y aneuploidía se asocia con un peor pronóstico clínico, aumento en la quimiorresistencia y desarrollo de metástasis, lo cual podría ser explicado en parte por la inducción de mecanismos de compensación de dosis génica (Carter et al., 2006; Jamal-Hanjani et al., 2017; Turajlic & Swanton, 2016).

El objetivo principal del presente trabajo fue identificar genes candidatos de compensación de dosis génica que podrían contribuir al proceso de sobrevivencia y proliferación de las subpoblaciones celulares inducidas por el daño genotóxico. Esto permitiría evaluar de forma preliminar las vías y genes subyacentes a esta regulación, específicamente a nivel transcripcional. Además, permite generar una línea de partida para

el estudio y validación experimental de las vías y los genes identificados como candidatos de compensación.

Por lo tanto, desarrollamos y estandarizamos un modelo *in vitro* de inestabilidad genómica acelerada a partir de una línea celular de cáncer de mama del panel NCI60. Para esto, definimos las dosis de quimioterapéuticos con el potencial de inducir muerte celular de una fracción de la población, pero que permitieran la sobrevivencia y proliferación de otras subpoblaciones celulares. Las subpoblaciones derivadas de la selección con el tratamiento quimioterapéutico podrían presentar un aumento en la inestabilidad genómica, lo cual se evidenciaría a nivel del cariotipo celular y a nivel de un aumento en la heterogeneidad con respecto a la población celular original, que podría sugerir la generación de nuevos subclones celulares.

El tratamiento con dosis subletales de CPT y ETO indujo un incremento en las fases S y G2/M respecto al control sin tratamiento (Fig. 7), sugestivo de un arresto en dichas fases del ciclo celular. Posteriormente, se calculó un índice de heterogeneidad basado en una tinción doble del ADN, con unión preferencial por GC o por AT, a partir de la cual se estimaron el número de subpoblaciones para cada tratamiento (Fig. 9). Esto permitió evidenciar que CPT y ETO no solo provocan un arresto del ciclo celular, probablemente transitorio a ciertas dosis, sino también un aumento en la heterogeneidad celular, asociado a un aumento en el número de las subpoblaciones.

Por otra parte, el análisis del cariotipo celular reveló que ambos tratamientos inducen alteraciones estructurales significativas, como cromosomas en forma de anillo, deleciones, formación de fragmentos, formas radiales, entre otros. Asimismo, se observó que el incremento en la concentración de las quimioterapias se asocia con un aumento en el tamaño y en la complejidad estructural de las alteraciones cromosómicas debido a que a mayor

concentración, las estructuras anormales radiales presentan interacción con un mayor número de cromosomas (Fig. 10 y Fig. 11).

La inestabilidad cromosómica estructural puede surgir de eventos de amplificación o deleción de segmentos cromosómicos, formación de estructuras extracromosomales y rearrreglos complejos de secuencias de nucleótidos, así como de aberraciones inducidas durante los procesos de reparación del daño al ADN y el manejo del estrés replicativo. Todo esto puede favorecer la segregación inadecuada de cromosomas durante la mitosis, lo que lleva a la formación de estructuras aberrantes (Hosea et al., 2024; Killcoyne et al., 2021; Y. Li et al., 2020). Lo anterior se traduce en un aumento en la inestabilidad genómica, lo que lleva posiblemente al aumento en la carga genética de ciertos genes que podrían desempeñar alguna función de resistencia, tolerancia y adaptación a las presiones selectivas del ambiente, para sobrevivir y proliferar.

La dosis más alta analizada para ambas quimioterapias, mostró el mayor cambio en el índice de heterogeneidad respecto a las células no tratadas, sin embargo, a esta dosis no fue posible visualizar cariotipos celulares con cromosomas íntegros (Fig. 12). Estudios previos han demostrado que, a dosis de 14  $\mu\text{M}$ , las tasas de sobrevivencia celular son del 22 % para CPT y del 9 % para ETO (Jiménez-Araya et al., datos no publicados). Por ello, aunque la dosis de 16  $\mu\text{M}$  indujo una mayor inestabilidad genómica, no se consideró para este modelo, dado que el objetivo es identificar un rango de dosis que maximice el daño genotóxico sin comprometer significativamente la viabilidad celular.

Con base en los resultados anteriores, el modelo de inestabilidad se limitó a las dosis de 6 y 8  $\mu\text{M}$  para CPT, y de 4 y 6  $\mu\text{M}$  para ETO, las cuales son dosis que se comportaron respectivamente en un rango equitóxico de acuerdo con las mediciones previas de supervivencia celular. Además, dichas dosis mostraron inestabilidad genómica y un aumento en la heterogeneidad celular.

Cabe resaltar que el modelo experimental de inestabilidad genómica acelerada pretende recapitular un fenómeno que ocurre *in vivo*. En tumores sólidos, la distribución de los fármacos es heterogénea, la variación de las concentraciones en diferentes regiones del tumor se atribuye en parte a la distancia de los vasos sanguíneos, de manera que las concentraciones del tratamiento disminuyen conforme más alejadas estén de los vasos. Esto implica que las células de cáncer más alejadas se exponen a dosis cada vez más bajas, incluido dosis subletales. De manera adicional, se sabe poco sobre el impacto de la exposición gradual a la quimioterapia en células previamente transformadas (Audet-Delage et al., 2023; Keating et al., 2013; S. Kim et al., 2018).

Las dosis de quimioterapias definidas en el modelo de inestabilidad genómica acelerada, capaces de inducir un fenotipo genéticamente inestable fueron utilizadas para tratar las células de cáncer de mama, en las mismas condiciones experimentales que en el modelo; lo anterior con el objetivo de caracterizar el perfil transcripcional y genético que exhiben estas células e identificar los genes candidatos de compensación de dosis génica, que podrían estar contribuyendo en la proliferación de las subpoblaciones celulares.

Con este fin, a partir de las condiciones definidas, realizamos la extracción del ARN y el ADN para cada condición y secuenciamos el transcriptoma y el exoma completo. Después del procesamiento de las lecturas y los análisis respectivos, realizamos un análisis de expresión diferencial y de inferencia del número de copias, con el fin de obtener el log<sub>2</sub> fold change y el p-value para la expresión de los ARNm secuenciados, a nivel de gen, y el log<sub>2</sub> ratio de sus respectivos números de copias, de todos los exones secuenciados (Fig. 4).

De tal forma, mediante el análisis del perfil transcripcional y genético del modelo de inestabilidad pudimos determinar que el tratamiento con CPT y ETO indujo, en 259 y 226 genes respectivamente, un aumento en el log<sub>2</sub> ratio, que a su vez no representó un cambio estadísticamente significativo en la expresión del gen, a nivel de ARNm, con respecto

al control sin tratamiento. Esto representó en promedio 0.8% de genes compensados del total de genes analizados (60109 genes), para cada condición genotóxica.

Algunos estudios han investigado la relación entre el número de copias de ciertos genes y la expresión diferencial en cáncer. Shao y colaboradores integraron de forma bioinformática datos de la variación en el número de copias y la expresión diferencial de líneas celulares y muestras de pacientes, con diferentes tipos de cáncer, obtenidos de bases de datos públicas. Ellos observaron que la mayoría de los genes (93%) presentaron amplificaciones o deleciones del número de copias y aumentos o disminuciones (respectivamente) del nivel de expresión, a los que llamaron “*genes altamente concordantes*”. Por otro lado, la porción más pequeña de genes (apenas 1%) mostraron amplificaciones o deleciones del número de copias y disminuciones o aumentos (respectivamente) del nivel de expresión, y a estos los llamaron “*genes altamente incongruentes*”; ya que lo biológicamente consistente es que un aumento en la dosis génica se refleje en un aumento de la expresión, sin embargo, esto no necesariamente ocurre así ya que existen distintos niveles de regulación de la expresión génica (Shao et al., 2019).

Lo anterior correlaciona con la proporción de genes (0.8%) que encontramos que tiene la totalidad de sus exones con un aumento en el número de copias y que no presentan cambios en la expresión transcripcional, ambos respecto al control sin tratamiento; semejante al concepto de genes altamente incongruentes descritos por Shao et al. Sin embargo, se debe considerar que estamos excluyendo el resto de los genes que presentaron compensación en algunos de sus exones, pero no en la totalidad. Por lo que el número de genes que pueden compensarse, por lo menos en algunos de sus exones, podría ser mayor.

En esta línea, otros estudios han documentado en datos de expresión de líneas celulares de cáncer y biopsias tumorales que 10% de los genes tienen baja adaptación a las alteraciones en el número de copias, un 51% adaptación media y un 39% tuvieron alta adaptación; lo que

sugiere que en la mayoría de los genes el efecto transcripcional de una alteración en el número de copias, en su posición genómica, está en su mayoría amortiguado por mecanismos adaptativos no genéticos (Bhattacharya et al., 2020).

Es importante destacar que ambos estudios anteriormente mencionados fueron realizados a partir de datos de expresión publicados en bases de datos públicas, mientras que en el presente trabajo de investigación realizamos el análisis comparando específicamente las células de cáncer con alteraciones previas (grupo control) y con las alteraciones que *in vitro* propiciamos mediante el tratamiento con la quimioterapia genotóxica (grupo tratamiento). Por lo que demostrados, al comparar con un control, que hubo aproximadamente una proporción de 0.8% de los genes que después del tratamiento quimioterapéutico y el daño genotóxico aumentaron su número de copias, pero que después de un tiempo que desconocemos, la expresión del mismo gen se reguló y fue equiparable con la expresión del control, o bien, que el aumento en el número de copias no representó en ningún punto de la evolución de las células un aumento consecuente en la expresión. Por lo que posiblemente los mecanismos de regulación de la expresión son activados por las células de cáncer para compensar el aumento en la dosis génica.

Por otro lado, la lista de genes aquí identificada permitirá orientar el estudio del fenómeno de compensación de dosis génica en células de cáncer, ya que sienta las bases para futuros estudios de validación experimental que permitan verificar que los genes están siendo compensados, descubrir el mecanismo de regulación transcripcional que está compensando la carga génica y los efectos que la compensación representa para las células de cáncer, principalmente en el contexto de la quimiorresistencia y cáncer aneuploide.

Seguidamente y a partir de las listas en común identificadas para cada tratamiento, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en la base de datos de KEGG para identificar y analizar las vías metabólicas o señalización que están sobrerrepresentadas o enriquecidas

en el conjunto de genes candidatos de compensación de dosis génica, así como facilitar la comprensión general de los roles biológicos de los genes de las vías sobrerrepresentadas.

Las vías enriquecidas funcionalmente en ambas quimioterapias fueron la *vía de señalización de Hippo, de Wnt y de PPAR* (Fig. 15 y Fig. 16). A continuación, se describe brevemente cada una de estas vías.

La *vía de señalización de Hippo* es una vía altamente conservada, que participa en la regulación de procesos relacionados con apoptosis, diferenciación y proliferación, es clave en el desarrollo y homeostasis embrionaria, y participa en la regulación del tamaño de los órganos (Fu et al., 2022; Heallen et al., 2011). Está compuesta por aproximadamente 30 proteínas, sin embargo, el núcleo central de la vía está compuesto por un grupo de quinasas MST1 y MST2 (MST1/2) y LATS1 y LATS2 (LATS1/2); sus proteínas adaptadoras SAV1 y MOB1A y MOB1B (MOB1A/B), respectivamente, así como otros componentes. Una vez que se activan estos componentes mediante una cascada de fosforilaciones, LATS1/2 fosforila dos co-activadores transcripcionales, YAP y TAZ, lo que provoca su retención en el citoplasma y degradación. Cuando la vía Hippo se inactiva, YAP y TAZ no fosforilados se translocan al núcleo, donde se unen a factores de transcripción como TEAD1-4 para iniciar la transcripción de genes involucrados en numerosos eventos relacionados con el crecimiento (Fu et al., 2022; Fu-Long & Kun-Liang, 2022; Ma et al., 2019).

Aunque los genes individuales de la señalización de Hippo rara vez se alteran en los cánceres humanos, la tasa general de alteración oncogénica de la vía Hippo es comparable a la de varios genes relacionados con cáncer. YAP/TAZ están altamente expresados y activados en varios tipos de cáncer humano, donde se ha visto que promueven la transformación celular, crecimiento tumoral, metástasis, recaída, quimiorresistencia y el mantenimiento de las células madre de cáncer. Se ha propuesto un modelo en el que el núcleo de quinasas de la vía actúa como un supresor de tumores y los co-activadores

transcripcionales YAP/TAZ actúan como proteínas oncogénicas (Fu-Long & Kun-Liang, 2022; Han et al., 2024; Yousefi et al., 2022).

Así mismo, aunque p53 y pRB son los guardianes clásicos que supervisan y detienen las células poliploides en G1, se ha identificado que Hippo actúa como un guardián alternativo para prevenir el estado poliploide; ya que algunos de los componentes de la vía tienen funciones importantes en el control del ciclo celular, al afectar la actividad del *factor E2 (E2F)*, que es un factor de transcripción clave en la transición del ciclo celular y la síntesis de ADN, además participan en el punto de control de tetraploidía en G1, la dinámica del centrosoma y la mitosis (Margolis et al., 2002; Xiao & Dong, 2021).

Las quinasas LATS1/2 de la vía Hippo se acumulan en los centrosomas durante la interfase y la mayor parte de la mitosis, y se ha observado que la eliminación (*knockout*) de LATS1/2 se asocia con una sobreduplicación del centrosoma, por lo que se ha sugerido que esta quinasas Hippo estabiliza algunas proteínas y ciclinas que fosforilan el factor de licenciamiento de duplicación de centriolos, lo que causa la amplificación descontrolada del centrosoma (Mukai et al., 2015). La compensación de la vía Hippo podría contribuir con la inestabilidad cromosómica que observamos en el cariotipo de las células de cáncer expuestas al tratamiento genotóxico, ya que la regulación a la baja de LATS1/2 podría ser un mecanismo que favorece no solo la proliferación celular, si no también que contribuye al fenotipo inestable observado.

La inactivación de Hippo conduce al aumento de la transcripción de genes relacionados con proliferación celular y diferenciación, por lo que sugerimos que posiblemente la compensación de los genes relacionados indirectamente con esta vía se asocia a una menor activación de la señalización por Hippo, que induce una mayor transcripción de genes relacionados con un fenotipo protumoral, mediado por TEAD. Además, LATS1/2 actúa como un gen supresor de tumores, por lo que los mecanismos de

regulación transcripcional de estos genes podrían asociarse a la inactivación de la vía y, por lo tanto, al favorecimiento de este fenotipo (Xiao & Dong, 2021).

Por otro lado, la activación de YAP1 promueve la resistencia a varias quimioterapias como CPT y ETO, en diferentes tipos de cáncer. El CPT induce la disminución MST y la activación de YAP, mientras que ETO induce la regulación a la baja LATS2 (Y. Zhao & Yang, 2015). Además, la sobreexpresión de YAP1 en células sensibles a CPT aumentó significativamente la resistencia a esta quimioterapia, en carcinoma de células escamosas de la lengua. Se sugiere que YAP1 forma un complejo que se une a la región promotora del gen *RAD51 recombinase (RAD51)* y activa su transcripción, lo que inactiva la vía de Hippo y disminuye la expresión de LATS1. La disminución de YAP1 inhibió la proliferación celular, la capacidad de formación de colonias y la migración, así como aumentó la sensibilidad al CPT, por otro lado, la sobreexpresión de YAP1 exacerbó las características malignas. YAP1 aumentó la resistencia al CPT al potenciar la capacidad de reparación del daño al ADN mediado por RAD51 (Guan & Deng, 2022).

Esta dualidad observada en los efectos de algunos componentes de la vía de Hippo, como las proteínas LATS1/2, que actúan como genes supresores de tumores, y YAP/TAZ, que funcionan como oncogenes, podría explicar por qué, para las células, resulta beneficioso aumentar la expresión de YAP/TAZ mediante la duplicación de sus copias génicas. Sin embargo, en cierto punto, podría ser más favorable reducir la expresión de LATS, lo que compensaría a nivel transcripcional el aumento de la carga génica en la vía y permitiría una regulación adaptativa de sus componentes según los requerimientos celulares.

No obstante, aunque parece evidente que los componentes de la vía Hippo desempeñan un papel fundamental en el fenotipo inestable observado en el modelo de inestabilidad genómica acelerada, los genes identificados en nuestro estudio no corresponden a los genes aquí descritos. Por lo tanto, aunque la desregulación de la vía parece desempeñar

un rol clave, se requieren estudios adicionales de validación y una exploración más profunda para comprender el estado de sus componentes principales en el modelo propuesto.

Otra de las vías enriquecidas funcionalmente en la lista de genes, fue la *vía de señalización de Wnt*, la cual es una red altamente conservada que desempeña un papel esencial en varios procesos biológicos, como la embriogénesis, la homeostasis y la regeneración de tejidos, además de regular la determinación del destino celular, la diferenciación, la apoptosis, la motilidad celular y el mantenimiento de células madre/progenitoras (Clevers, 2006). Esta vía se divide en dos subtipos principales: la canónica, dependiente de  $\beta$ -catenina, y la no canónica, que incluye las vías Wnt/planar cell polarity (PCP) y Wnt/calcio (Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ). Las proteínas Wnt son glicoproteínas que participan en la comunicación célula-célula, son secretadas a la matriz extracelular para activar diversas cascadas de señalización (Niehrs & Acebron, 2012). Existen 19 glicoproteínas Wnt que actúan como ligandos, conservados en diversas especies, y se unen a más de 15 tipos de receptores y correceptores de membrana, como Fz (Teratani et al., 2018).

En general la vía canónica (dependiente de  $\beta$ -catenina) se encuentra apagada cuando en ausencia de Wnt, la  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo proteico, lo que resulta en una inhibición de la transcripción. Sin embargo, cuando se activa cuando los ligandos Wnt se unen a los receptores FZD y LDL Receptor Related Protein 1 (LRP) en la membrana celular y reclutan Dishevelled Segment Polarity Protein 1 (DVL), que bloquea el complejo de degradación y la  $\beta$ -catenina se acumula en citoplasma y se transloca al núcleo donde activa la transcripción de muchos genes. En la vía no canónica (independiente de  $\beta$ -catenina) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , se activa cuando Wnt se une al receptor FZD y activa una fosfolipasa C de membrana, que genera inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) lo que induce la liberación de calcio intracelular, esto activa proteínas que regulan la transcripción génica y respuestas celulares. Mientras que en la vía PCP, algunas proteínas activan FZD y estimulan

vías como RHO que participan en la remodelación del citoesqueleto para dirigir polaridad y motilidad celular (Hayat et al., 2022).

El cáncer de mama fue el primer tipo de cáncer asociado con la señalización Wnt, y se ha demostrado que esta vía regula procesos como la proliferación, metástasis, microambiente inmune, pluripotencialidad, resistencia terapéutica y el fenotipo tumoral. En aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer de mama, la vía Wnt está inactivada y se asocia con una menor supervivencia global (Xu et al., 2020; Zhan et al., 2017). Aunque las mutaciones somáticas en reguladores clave de la vía son raras, los ligandos y receptores canónicos suelen estar sobreexpresados, mientras que los antagonistas secretados están silenciados. En un modelo de cáncer de mama, se mostró que la heterogeneidad tumoral es sostenida por subclones que cooperan y son impulsados por la expresión aberrante de Wnt1, lo que resulta crucial para el crecimiento (Cleary et al., 2014).

En particular, la señalización Wnt juega un papel clave en la resistencia a la quimioterapia, ya que su inactivación induce un estado de quiescencia en las células madre del cáncer de mama. Además, regula la formación y autorrenovación de estas células madre de cáncer, lo que contribuye a la heterogeneidad tumoral y la resistencia a fármacos (N. Li & Clevers, 2010; Xu et al., 2020). La vía también activa transportadores ABC como MDR1 y ABCG2, que expulsan fármacos de las células, exacerbando la resistencia a medicamentos. En tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER), la vía Wnt aumenta la expresión de Sox2, lo que mantiene el fenotipo de las BCSCs y reduce la sensibilidad al tamoxifeno. Se ha sugerido que la vitamina D3 podría aumentar la sensibilidad a este fármaco al inhibir la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Loh et al., 2013; Xu et al., 2020; Z. M. Zhang et al., 2016).

A diferencia de la vía Hippo, se ha observado que algunas proteínas de señalización de Wnt fueron compensadas después del daño genotóxico, como los ligandos FZD1/2 y Wnt4. Se ha reportado que mutaciones en algunos de los componentes de la vía, como el gen

APC, inducen proteínas truncadas que activan la vía Wnt y causan pérdida de adhesión celular, reparación defectuosa del ADN, desestabilización cromosómica y funciones antiapoptóticas comprometidas. Asimismo, mutaciones en RNF43, una ligasa E3 de ubiquitina que inhibe Wnt/ $\beta$ -catenina mediando la ubiquitinación de FZD, se observan en varios tipos de cáncer; la ausencia de RNF43 aumenta la resistencia a la radiación y la quimioterapia. Por otro lado, los genes que participan en la vía Wnt pueden estar sujetos a modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, regulación por microARNs o ARNs largos no codificantes (Song et al., 2024)

Nuestros resultados muestran un enriquecimiento funcional de la vía Wnt en la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica después del tratamiento con quimioterapia genotóxica. Observamos un aumento en el log<sub>2</sub> ratio del número de copias en esta vía, mientras que la expresión del ARN mensajero no mostró cambios significativos respecto al control.

El enriquecimiento de la vía Wnt en la lista de genes que identificamos podría estar relacionado con mecanismos de reprogramación celular y estabilidad del genoma que se activan tras el daño genotóxico. En un estudio Guo y colaboradores demostraron que la inhibición de la vía Wnt es fundamental para estabilizar las células madre humanas en un estado “*naive*” de pluripotencia, lo que permite que estas células restablezcan un fenotipo característico del embrión temprano. Así, la reactivación o modulación de esta vía en nuestras muestras podría reflejar una respuesta compensatoria, que busca mantener la homeostasis genética y celular frente al daño inducido por la quimioterapia (Guo et al., 2017).

Además, se ha observado que las alteraciones en la señalización por Wnt están estrechamente relacionadas con el mantenimiento de la proliferación de células madre de cáncer (CSC), ya que la hiperactivación de la vía de señalización Wnt es fundamental para apoyar la supervivencia de las células cancerosas. La formación de resistencia a los fármacos

podría atribuirse a algunos mecanismos diferentes, como la adquisición de quiescencia, la interacción con el microambiente, la capacidad de eflujo de fármacos, el aumento de la resistencia a la apoptosis y el aumento de la reparación del ADN. Las pequeñas poblaciones de CSC presentes en el tumor tienen un mecanismo de reparación más alto y también son altamente resistentes a la quimioterapia. Los tratamientos pueden desencadenar una serie de mecanismos en respuesta al estrés celular que las propiedades de las células de cáncer, mejorando su adaptación y supervivencia (X. Zhang & Yu, 2023).

Por lo tanto, consideramos que la vía Wnt debe ser estudiada con mayor profundidad en el contexto del estudio que aquí proponemos, ya que la compensación de la dosis génica de algunos de los componentes de esta vía podría representar un mecanismo para restablecer un fenotipo pluripotente en células de cáncer. Este fenómeno podría favorecer la heterogeneidad celular observada en nuestro modelo. Por lo que proponemos que la compensación de la vía Wnt podría ser uno de los mecanismos subyacentes responsables de la generación de un fenotipo protumoral más agresivo.

Así mismo, identificamos en la lista de genes la **vía de señalización PPAR** o vía de receptores activados por proliferadores de peroxisomas, la cual es clave en la regulación de muchos procesos biológicos, principalmente a nivel del metabolismo de ácidos grasos, la represión transcripcional mediante la interacción con otros factores de transcripción, como *NFκB*, *STAT-1* y componentes de la señalización *AP-1*. Los *PPAR* comprenden aproximadamente 48 proteínas y están filogenéticamente relacionados con la superfamilia de factores hormonales nucleares, constituyendo un subconjunto dentro de esta superfamilia. Se han identificado tres isoformas: *PPARα* (*NR1C1*), *PPARβ/δ* (*NR1C2*) y *PPARγ* (*NR1C3*), codificadas por genes diferentes, cada uno con un patrón de función específico en distintos tipos celulares. Dependiendo de su activación, la expresión de los *PPAR* varía en diversas células, incluidas las células inmunitarias, epiteliales y endoteliales. Además, difieren en su perfil de expresión tisular, ligandos, y agonistas y antagonistas específicos. Las proteínas

*PPAR* forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR), tras unirse a un ligando agonista endógeno, como algunas prostaglandinas, ácidos grasos, triglicéridos y ácido retinoico (Asgharzadeh et al., 2024; Berger & Moller, 2002; Wagner & Wagner, 2020).

Se ha estudiado la señalización por la vía *PPAR* en organoides *in vitro* de cáncer colorrectal, donde se determinó que la vía está activa de forma prevalente y aberrante en las células tumorales (Wang et al., 2022). Los ensayos clínicos de agonistas de *PPAR* $\gamma$  en carcinogénesis no han mostrado resultados concluyentes. Sin embargo, también se han reportado efectos pro-tumorales para algunos agonistas de *PPAR* $\gamma$ . Los ligandos de *PPARs* mejoran la apoptosis inducida por ETO en varias líneas celulares de leucemia y fue dependiente de *PPAR* $\gamma$ , mediante un mecanismo de modulación de la expresión de toisomerasa (Topo) II Alpha, a través de la unión a un sitio similar a DRA (Direct Repeat 1) en el promotor de TopoIIalpha está involucrado en la regulación transcripcional dependiente de los ligandos de *PPAR* $\gamma$  y del heterodímero *PPAR* $\gamma$ /*RXR* $\alpha$  (Mirza et al., 2019; Peters et al., 2012).

El rol biológico de la vía de señalización de *PPAR* en el modelo que proponemos y en el contexto de los genes candidatos de compensación de dosis génica que identificamos es complejo y suponemos que podría tener un papel importante a nivel del metabolismo celular, que permita suplir algunos de los requerimientos metabólicos de las células en un determinado tiempo. Por otro lado, muchas de las moléculas que están relacionadas con la vía de *PPAR* podrían tener algún rol importante en la señalización o comunicación con otras vías. Sin embargo, destacamos la importancia de verificar experimentalmente y con más estudios los roles específicos de las vías que aquí identificamos.

Por otro lado, se han realizado distintos esfuerzos para estudiar la adaptación transcripcional a las alteraciones en el número de copias, Bhattacharya y colaboradores (2020) realizaron un estudio utilizando 34494 perfiles de expresión génica de

repositorios públicos como Gene Expression Omnibus (GEO), Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) y Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC), donde observaron que los genes con un menor grado de adaptación transcripcional estaban altamente enriquecidos en conjuntos génicos involucrados en la proliferación. Por el contrario, los genes con un mayor grado de adaptación transcripcional estaban altamente enriquecidos en conjuntos génicos relacionados con el sistema inmune. Además, notaron que la mayoría de los oncogenes en el conjunto de datos presentaba un alto grado de adaptación transcripcional, lo que sugiere que la elevación de la expresión de muchos oncogenes es beneficiosa para la progresión tumoral solo hasta cierto punto; niveles excesivos de expresión de varios oncogenes se han vinculado previamente con la senescencia celular y la apoptosis (Bhattacharya et al., 2020).

Sin embargo, las vías de señalización que aquí identificamos y asociamos que están enriquecidas funcionalmente en la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica están principalmente relacionadas con diferenciación celular, proliferación, embriogénesis, mantenimiento de células madre, regulación del tamaño de los órganos y regeneración de tejidos (Hippo y Wnt), así como asociados con metabolismo de ácidos grasos y represión transcripcional (PPAR). Lo que sugiere que los genes con mayor grado de adaptación transcripcional o compensados, se asocian a vías de proliferación y no están relacionados con el sistema inmune, como describió Bhattacharya et al. (2020).

Posterior al análisis de enriquecimiento funcional de las vías se procedió a evaluar las **vías de regulación dadas por factores de transcripción y micro ARNs**, mediante BioNet UCR e identificamos 6 factores de transcripción: *GRHL2*, *NR3C1*, *GATA3*, *MYB*, *MYC* y *PPARA* como potenciales reguladores transcripcionales de la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica (Fig. 17 y Fig. 18). Para cada factor de transcripción identificado se generaron las redes de interacción con los microARNs (Anexo 9 y 10).

La identificación de vías de regulación a nivel transcripcional es relevante en el contexto que aquí estudiamos dado que se ha planteado que podría ser un mecanismo por el cual las células de cáncer toleran un alto grado de aneuploidía. Mohanty y colaboradores realizaron un análisis multiómico integrador utilizando el conjunto de datos de The Cancer Genome Atlas (TCGA), con 5000 muestras de tumores individuales y encontraron que el desacoplamiento de la expresión de ARNm del número de copias es muy común en células de cáncer y se asocia con un aumento en la señalización oncogénica, de proliferación y de supresión inmune. Además, plantean que la presión selectiva que se ejerza sobre el tumor va a inducir ciertos cambios en el número de copias, específicos, que pueden ser tóxicos para las células, lo que favorece la activación de mecanismos de regulación que neutralicen estos cambios. Esto podría llevar a la selección una reprogramación regulatoria que regule estos cambios en el número de copias, lo que resulta en el desacoplamiento de la expresión de ARNm del número de copias. Además, identificaron que los cambios regulatorios son mediados por factores de transcripción y de hecho, lograron encontrar 21 factores de transcripción como posibles blancos terapéuticos. Sin embargo, se revisó la lista de factores identificada en este estudio y no se encontró coincidencia con los factores de transcripción que identificamos en el presente trabajo de investigación (Mohanty et al., 2021).

A continuación, realizamos una breve descripción de cada uno de los factores de transcripción que se identificaron como reguladores de la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica, en el modelo de inestabilidad genómica acelerada.

*GRHL2* es un factor de transcripción de mamíferos y es uno de los tres homólogos de *Drosophila Grainyhead (GRH)*, conocidos en mamíferos, con *GRHL1* y *GRHL3*, los cuales está involucrados en la morfogénesis epitelial y la neurulación primaria. Participa en la regulación de expresión *telomerase reverse transcriptase (TERT)*, aumenta proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos, afecta la diferenciación de queratinocitos, orquesta el desarrollo de la barrera epitelial mediante la activación transcripcional de genes asociados

adhesión celular y controla la regulación de la expresión del gen *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*, lo que sugiere que está involucrado en la replicación del ADN (Chen et al., 2012; Petrof et al., 2014).

*NR3C1* es un gen que codifica por el receptor de glucocorticoides (GR), que también actúa como factor transcripcional al unirse a elementos de respuesta en los promotores de genes sensibles a glucocorticoides y activar su transcripción; se encuentra presente en casi todos los tejidos, sin embargo, genera isoformas funcionales específicas según el tipo celular. Participa en el control de la transcripción mediada por glucocorticoides en diferentes tejidos, regula respuestas inflamatorias, metabolismo, proliferación, diferenciación y respuesta al estrés (Fadda et al., 2017; Lu & Cidlowski, 2005; Motavalli et al., 2021).

*PPARA* es un TF que pertenece a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales forman parte de la familia de receptores nucleares. Actúan como heterodímeros con el receptor X retinoide, tras unirse a un agonista, como el leucotrieno B4 en el caso de PPARA, interactúan con cofactores que aumentan la tasa de iniciación de la transcripción. Participan en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, homeostasis de glucosa, estimula beta-oxidación de ácidos grasos, disminuye factores inflamatorios, influye en proliferación celular, diferenciación y apoptosis, así como interfiere negativamente con las vías de señalización NF-kappaB, STAT y AP (Berger & Moller, 2002; Berger & Wagner, 2002; Chinetti et al., 2000; B. Zhao et al., 2023).

*MYB* es un factor de transcripción altamente conservado, en humanos los genes *MYB* están compuestos por: *MYB*, *MYBL1* y *MYBL2*; sin embargo, aunque son estructuralmente similares, se ha sugerido que tienen roles biológicos distintos. Es considerado un oncogén involucrado en varias leucemias humanas, así como algunos tipos de cáncer sólido como cáncer de mama y cáncer de colon. Participa en el desarrollo, supervivencia, proliferación y

homeostasis celular, así como un rol clave regulador de células madre y progenitoras en algunos tejidos (Cicirò & Sala, 2021; Lipsick & Wang, 1999; Ramsay & Gonda, 2008).

*GATA3* es un factor de transcripción de la familia de factores con dedos de Zinc, se une a promotores y potenciadores de cromatina nucleosomal o cerrada, lo que permite aumentar el acceso a la cromatina. El rol más conocido es la regulación de la diferenciación de células T helper, aunque se ha demostrado que es crucial para el desarrollo, proliferación y mantenimiento de las células T, también orquesta la expresión en células trofoblásticas, es crucial en la morfogénesis y mantenimiento del estado de diferenciación del tejido mamario (Kouros-Mehr et al., 2006; Maneechotesuwan et al., 2007; Paul et al., 2017; Qiang et al., 2023; Wan, 2014).

*MYC* es un superfactor de transcripción y proto-oncogén que codifica las oncoproteínas MYC (C-myc, N-myc y L-myc), las cuales controlan la transcripción de aproximadamente el 15 % de los genes expresados. Estas proteínas desempeñan un papel crucial en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. Además, regula la transcripción de genes implicados en la biogénesis de ribosomas, traducción de mRNA, regulación del ciclo celular y respuestas al estrés. Este proceso impacta una amplia gama de eventos biológicos, como proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, regulación inmune, regula los procesos de reprogramación somática y autorrenovación de células madre embrionarias, activa ARN polimerasa II (Ahmadi et al., 2021; Dang et al., 2006; David et al., 2010; J. Y. Kim et al., 2015).

El grado de adaptación transcripcional a la alteración en el número de copias generalmente se estudia mediante un enfoque en el que se combinan perfiles genómicos y de expresión génica, emparejados de muestras tumorales y muestras no-tumorales. Sin embargo, se ha demostrado que este enfoque no es adecuado para detectar los efectos de las alteraciones genéticas en los niveles de expresión, ya que suelen ser realizados en biopsias que

comprenden una variedad de células del microambiente tumoral, sean o no células de cáncer. Por lo que el perfil transcripcional mide la expresión promedio de todos los tipos celulares presentes, y a pesar de ser comparado contra un control de tejido normal, los efectos de las alteraciones en el número de copias se verán influenciados no solo por factores experimentales, si no también podrían ser opacados por los efectos de las células no tumorales. Así mismo hay pocos perfiles genómicos y de expresión de muestras tumorales emparejadas que se encuentren disponibles y que hayan sido realizados en estudios a gran escala (Bhattacharya et al., 2020).

En ese sentido, la presente tesis de investigación representa un avance en el estudio de la compensación, ya que al trabajar con una línea celular de cáncer de mama e inducir las alteraciones genéticas mediante el tratamiento con quimioterapia genotóxica, estamos identificando específicamente los genes que lograron compensarse después de un aumento en el número de copias, sin interferencias asociadas a la presencia de otras células no tumorales. Sin embargo, se debe destacar que aunque sí realizamos el estudio con una muestra clonal de células de cáncer, la secuenciación del transcriptoma se realizó en “bulk” o en masa, por lo tanto, las subpoblaciones más abundantes tendrán mayor representación a nivel de los transcritos identificados y cuantificados, que las subpoblaciones que están en menor cantidad y que sin embargo podrían ser las responsables de resistir y continuar proliferando. Por lo tanto, proponemos que se podría realizar el mismo modelo de estudio de una forma más minuciosa mediante una secuenciación a nivel de células individuales, lo que permitiría tener un panorama completo del perfil transcripcional a nivel de células individuales y del comportamiento de las diferentes subpoblaciones inducidas por el modelo de inestabilidad.

Los distintos esfuerzos que se han realizado para estudiar los efectos de las alteraciones en el número de copias a partir de una biopsia tumoral no emparejada y los resultados de estos proyectos han dado una luz de los efectos transcripcionales de la

alteración en el número de copias sobre vías biológicas (Bhattacharya et al., 2020; Fehrmann et al., 2015). Sin embargo, a nuestro conocimiento, la presente tesis de maestría representa el primer trabajo de investigación que demuestra que el daño genotóxico es capaz de inducir fenómenos de compensación de dosis génica, en células de cáncer con alteraciones genéticas previamente establecidas.

Como se mencionó previamente, planteamos la hipótesis de que las células de cáncer de mama inducen mecanismos de compensación de dosis génica frente al daño genotóxico, lo que favorece su supervivencia y proliferación celular. Aunque la aneuploidía suele ser perjudicial para las células, en algunos casos puede proporcionar una ventaja selectiva que les permite adaptarse a presiones ambientales, como el daño genotóxico inducido por quimioterapéuticos. De esta manera, la inestabilidad cromosómica facilita la plasticidad fenotípica necesaria para tolerar este estrés, lo que favorece la aparición de clones capaces de sobrevivir. Una vez superado este cuello de botella evolutivo, estas subpoblaciones pueden evolucionar hacia fenotipos más agresivos.

La estandarización del modelo de inestabilidad permitió demostrar que la quimioterapia genotóxica, específicamente el cisplatino y el etopósido, en las condiciones estudiadas, promueve la proliferación de una fracción celular con aumento en la inestabilidad genómica y la heterogeneidad celular. Además, se observó que el fenómeno de compensación de dosis génica puede ser inducido *in vitro* en células de cáncer de mama mediante el tratamiento con estos agentes genotóxicos, ya que se identificó una lista de genes candidatos de compensación tras el tratamiento.

El perfil funcional de esta lista de genes permitió identificar vías de señalización evolutivamente conservadas, relacionadas con procesos esenciales como la embriogénesis, proliferación, diferenciación, crecimiento celular, regeneración de tejidos, apoptosis, desarrollo, homeostasis génica y destino celular. Además, los genes identificados como

factores de transcripción actúan como reguladores maestros de la expresión génica, ya sea de manera directa o indirecta. Estos genes comparten funciones clave en proliferación celular, diferenciación, apoptosis, regulación y respuesta al estrés, y están implicados en procesos metabólicos, inflamación y respuesta inmune.

Por lo tanto, sugerimos que las células de cáncer son capaces de tolerar el daño al ADN mediante la inducción de estos mecanismos de compensación, que favorecen la adaptación y supervivencia celular. Esto, sumado al aumento de la heterogeneidad celular, podría representar un desafío clínico importante, ya que puede favorecer la aparición de fenotipos quimiorresistentes, lo que compromete tanto la efectividad del tratamiento como el pronóstico del paciente. Además, los genes identificados deben presentar una alta restricción evolutiva al cambio a nivel transcripcional, a pesar de las variaciones inducidas en su número de copias, lo que los convierte en potenciales blancos terapéuticos, ya que podrían desempeñar un papel clave en la supervivencia y proliferación de las células cancerígenas. La identificación de las vías de regulación mediadas por factores de transcripción y microARNs representa un primer paso para entender cómo se regula la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica identificada. Finalmente destacamos la importancia de realizar estudios de validación experimental que verifiquen que los genes que aquí identificamos logran ser compensados, los mecanismos por los cuales se compensan y el rol de estos genes en la supervivencia y proliferación celular.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con base en los resultados y lo discutido anterior se concluye puntualmente que:

- La quimioterapia genotóxica, específicamente cisplatino y etopósido en las condiciones estudiadas, aumentan la inestabilidad genómica y la heterogeneidad celular, lo que sugiere que las células tumorales activan mecanismos moleculares de adaptación para tolerar el daño y sobrevivir.
- El aumento en la heterogeneidad celular después del tratamiento con dosis subletales de quimioterapia genotóxica podría correlacionar con hallazgos previos que establecen que el aumento de la inestabilidad se asocia con fallo terapéutico y mal pronóstico.
- Se demostró que el fenómeno de compensación de dosis génica puede ser inducido *in vitro* en células de cáncer de mama, mediante el tratamiento con agentes genotóxicos como cisplatino y etopósido.
- Se identificó una lista de genes candidatos de compensación de dosis génica, después del tratamiento con dosis subletales de quimioterapia genotóxica, lo que sugiere que parte de los mecanismos moleculares de adaptación que activan las células pueden involucrar la compensación de genes que están amplificados.
- Las principales vías de señalización identificadas son evolutivamente muy conservadas y están relacionadas con procesos esenciales en el desarrollo y la embriogénesis, proliferación, diferenciación, apoptosis y homeostasis.
- Los factores de transcripción identificados desempeñan un papel central en la regulación de procesos clave como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y respuesta al estrés, además de estar involucrados en funciones metabólicas, inflamatorias y de respuesta inmune.

Además, se plantean algunas perspectivas a futuro para mejorar el entendimiento de los mecanismos de compensación de dosis génica, su participación en la respuesta al daño genotóxico y su contribución en los procesos de proliferación y supervivencia celular:

- Validar la lista de genes candidatos de compensación de dosis génica mediante secuenciación de células individuales para mejorar la precisión en la interpretación de resultados y comparar con la técnica de secuenciación en bulk realizada en la presente tesis de maestría.
- Validar experimentalmente el fenómeno de compensación de dosis génica en la lista de genes identificados, con técnicas como *tug-of-war*.
- Investigar con profundidad los mecanismos moleculares de las principales vías de señalización, para determinar su rol en la compensación de dosis génica y su relación con la progresión tumoral, en el contexto de daño al ADN inducido por quimioterapia genotóxica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acón, M., Oviedo, G., Baez, E., Vasquez-Vargas, G., Guevara-Coto, J., Segura-Castillo, A., Siles-Canales, F., Quiros-Barrantes, S., Mendes, P., & Mora-Rodríguez, R. (2020). Complex networks of miRNA-transcription factors mediate gene dosage compensation in aneuploid cancer. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.31.928507>
- Acón, M. S., Geiß, C., Torres-Calvo, J., Bravo-Estupiñan, D., Oviedo, G., Arias-Arias, J. L., Rojas-Matey, L. A., Edwin, B., Vásquez-Vargas, G., Osés-Vargas, Y., Guevara-Coto, J., Segura-Castillo, A., Siles-Canales, F., Quirós-Barrantes, S., Régnier-Vigouroux, A., Mendes, P., & Mora-Rodríguez, R. (2021). MYC dosage compensation is mediated by miRNA-transcription factor interactions in aneuploid cancer. *IScience*, 24(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103407>
- Acón, M. S., Siles, F., & Mora, R. (2018). Modeling Gene Dosage Compensation Mediated by Sensor Loops in Large-Scale Mathematical Models of MicroRNA-Transcription Factor Networks. *2018 IEEE International Work Conference on Bioinspired Intelligence, IWOB1 2018 - Proceedings*. <https://doi.org/10.1109/IWOB1.2018.8464210>
- Ahmadi, S. E., Rahimi, S., Zarandi, B., Chegeni, R., & Safa, M. (2021). MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *Journal of Hematology & Oncology 2021 14:1*, 14(1), 1–49. <https://doi.org/10.1186/S13045-021-01111-4>
- Alser, M., Rotman, J., Deshpande, D., Taraszka, K., Shi, H., Baykal, P. I., Yang, H. T., Xue, V., Knyazev, S., Singer, B. D., Balliu, B., Koslicki, D., Skums, P., Zelikovsky, A., Alkan, C., Mutlu, O., & Mangul, S. (2021). Technology dictates algorithms: recent developments in read alignment. In *Genome Biology* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02443-7>
- Andrews, P. A., Mann, S. C., Huynh, H. H., & Albright, K. D. (1991). Role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase in the Accumulation of cis-Diamminedichloroplatinum(II) in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 51(14), 3677–3681.
- Andrews, S. (n.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data* (0.12.1).
- Asgharzadeh, F., Memarzia, A., Alikhani, V., Beigoli, S., & Boskabady, M. H. (2024). Peroxisome proliferator-activated receptors: Key regulators of tumor progression and growth. *Translational Oncology*, 47, 102039. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2024.102039>

- Audet-Delage, Y., St-Louis, C., Minarrieta, L., McGuirk, S., Kurreal, I., Annis, M. G., Mer, A. S., Siegel, P. M., & St-Pierre, J. (2023). Spatiotemporal modeling of chemoresistance evolution in breast tumors uncovers dependencies on SLC38A7 and SLC46A1. *Cell Reports*, 42(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113191>
- Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5(4), 363–372. <https://doi.org/10.2174/1568011054222364>
- Barnett, D. W., Garrison, E. K., Quinlan, A. R., Střimberg, M. P., & Marth, G. T. (2011). BamTools: a C++ API and toolkit for analyzing and managing BAM files. *Bioinformatics*, 27(12), 1691–1692. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR174>
- Bayani, J., Selvarajah, S., Maire, G., Vukovic, B., Al-Romaih, K., Zielenska, M., & Squire, J. A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*, 17(1), 5–18. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2006.10.006>
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53, 409–435. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.53.082901.104018>
- Berger, J., & Wagner, J. A. (2002). Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 4(2), 163–174. <https://doi.org/10.1089/15209150260007381>
- Bhattacharya, A., Bense, R. D., Urzúa-Traslaviña, C. G., de Vries, E. G. E., van Vugt, M. A. T. M., & Fehrmann, R. S. N. (2020). Transcriptional effects of copy number alterations in a large set of human cancers. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14605-5>
- Bindea, G., Galon, J., & Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*, 29(5), 661. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT019>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pagès, F., Trajanoski, Z., & Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP101>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brennan, C. M., Vaites, L. P., Wells, J. N., Santaguida, S., Paulo, J. A., Storchova, Z., Harper, J. W., Marsh, J. A., & Amon, A. (2019). Protein aggregation mediates stoichiometry of protein complexes in aneuploid cells. *Genes and Development*, *33*(15–16), 1031–1047. <https://doi.org/10.1101/gad.327494.119>
- Bromberg, K. D., Burgin, A. B., & Osheroff, N. (2003). A Two-drug Model for Etoposide Action against Human Topoisomerase II $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 7406–7412. <https://doi.org/10.1074/JBC.M212056200>
- Burden, D. A., Kingma, P. S., Froelich-Ammon, S. J., Bjornsti, M. A., Patchan, M. W., Thompson, R. B., & Osheroff, N. (1996). Topoisomerase II·Etoposide Interactions Direct the Formation of Drug-induced Enzyme-DNA Cleavage Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 29238–29244. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.46.29238>
- Carney, D. N. (1991). The Pharmacology of Intravenous and Oral Etoposide. *Cancer*, *1*(67), 299–302. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910101\)67:1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910101)67:1)
- Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N., & Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nature Genetics* 2006 *38*:9, *38*(9), 1043–1048. <https://doi.org/10.1038/ng1861>
- Chabner, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, *5*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>
- Charlier, C., Kintz, P., Dubois, N., & Plomteux, G. (2004). Fatal Overdose with Cisplatin. *Journal of Analytical Toxicology*, *28*(2), 138–140. <https://doi.org/10.1093/jat/28.2.138>
- Chen, W., Xiao Liu, Z., Oh, J. E., Shin, K. H., Kim, R. H., Jiang, M., Park, N. H., & Kang, M. K. (2012). Grainyhead-like 2 (GRHL2) inhibits keratinocyte differentiation through epigenetic mechanism. *Cell Death & Disease*, *3*(12). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2012.190>
- Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, *49*(10), 497–505. <https://doi.org/10.1007/S000110050622>

- Chunduri, N. K., & Storchová, Z. (2019). The diverse consequences of aneuploidy. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 54–62). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0243-8>
- Cicirò, Y., & Sala, A. (2021). MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer. In *Oncogenesis* (Vol. 10, Issue 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00309-y>
- Cleary, A. S., Leonard, T. L., Gestl, S. A., & Gunther, E. J. (2014). Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*, *508*(7494), 113–117. <https://doi.org/10.1038/NATURE13187>
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, *127*(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.10.018>
- Cohen-Sharir, Y., McFarland, J. M., Abdusamad, M., Marquis, C., Bernhard, S. V., Kazachkova, M., Tang, H., Ippolito, M. R., Laue, K., Zerbib, J., Malaby, H. L. H., Jones, A., Stautmeister, L. M., Bockaj, I., Wardenaar, R., Lyons, N., Nagaraja, A., Bass, A. J., Spierings, D. C. J., ... Ben-David, U. (2021). Aneuploidy renders cancer cells vulnerable to mitotic checkpoint inhibition. *Nature* *2021* *590*:7846, *590*(7846), 486–491. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03114-6>
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* *2005* *6*:11, *6*(11), 836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., & Davies, R. M. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, *10*(2), 1–4. <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008>
- Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., & Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, *16*(4), 253–264. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2006.07.014>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, *463*(7279), 364–368. <https://doi.org/10.1038/NATURE08697>

- DeConti, R. C., Toftness, B. R., Lange, R. C., & Creasey, W. A. (1973). Clinical and Pharmacological Studies with cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Research*, 33(6), 1310–1315.
- Donnelly, N., Passerini, V., Dürrbaum, M., Stingele, S., & Storchová, Z. (2014). HSF1 deficiency and impaired HSP90-dependent protein folding are hallmarks of aneuploid human cells. *The EMBO Journal*, 33(20), 2374. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201488648>
- Duncan, A. W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(4), 347–356. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2013.01.003>
- Duncan, A. W., Hanlon Newell, A. E., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S. B., Thayer, M. J., Strom, S. C., & Grompe, M. (2012). Frequent Aneuploidy Among Normal Human Hepatocytes. *Gastroenterology*, 142(1), 25–28. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.10.029>
- Duncan, A. W., Taylor, M. H., Hickey, R. D., Hanlon Newell, A. E., Lenzi, M. L., Olson, S. B., Finegold, M. J., & Grompe, M. (2010). The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*, 467(7316), 707–710. <https://doi.org/10.1038/NATURE09414>
- Dürrbaum, M., & Storchová, Z. (2016). Effects of aneuploidy on gene expression: Implications for cancer. *FEBS Journal*, 283(5), 791–802. <https://doi.org/10.1111/febs.13591>
- Eljack, N. D., Ma, H. Y. M., Drucker, J., Shen, C., Hambley, T. W., New, E. J., Friedrich, T., & Clarke, R. J. (2014). Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics*, 6(11), 2126–2133. <https://doi.org/10.1039/C4MT00238E>
- Fadda, A., Syed, N., Mackeh, R., Papadopoulou, A., Suzuki, S., Jithesh, P. V., & Kino, T. (2017). Genome-wide Regulatory Roles of the C2H2-type Zinc Finger Protein ZNF764 on the Glucocorticoid Receptor. *Scientific Reports*, 7, 41598. <https://doi.org/10.1038/SREP41598>
- Fehrmann, R. S. N., Karjalainen, J. M., Krajewska, M., Westra, H. J., Maloney, D., Simeonov, A., Pers, T. H., Hirschhorn, J. N., Jansen, R. C., Schultes, E. A., Van Haagen, H. H. H. B. M., De Vries, E. G. E., Te Meerman, G. J., Wijmenga, C., Van Vugt, M. A. T. M., & Franke, L. (2015). Gene expression analysis identifies global gene dosage sensitivity in cancer. *Nature Genetics*, 47(2), 115–125. <https://doi.org/10.1038/ng.3173>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. IARC. <https://gco.iarc.who.int/today>

- Forgie, B. N., Prakash, R., & Telleria, C. M. (2022). Revisiting the Anti-Cancer Toxicity of Clinically Approved Platinating Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 15410, 23(23), 15410. <https://doi.org/10.3390/IJMS232315410>
- Fu, M., Hu, Y., Lan, T., Guan, K. L., Luo, T., & Luo, M. (2022). The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01191-9>
- Fu-Long, L., & Kun-Liang, G. (2022). The two sides of Hippo pathway in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 85, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.07.006>
- Girish, V., Lakhani, A. A., Thompson, S. L., Scaduto, C. M., Brown, L. M., Hagenson, R. A., Sausville, E. L., Mendelson, B. E., Kandikuppa, P. K., Lukow, D. A., Yuan, M. Lou, Stevens, E. C., Lee, S. N., Schukken, K. M., Akalu, S. M., Vasudevan, A., Zou, C., Salovska, B., Li, W., ... Sheltzer, J. M. (2023). Oncogene-like addiction to aneuploidy in human cancers. *Science*, 381(6660). <https://doi.org/10.1126/science.adg4521>
- Guan, H., & Deng, L. (2022). Yes-associated protein 1 exerts its tumor-promoting effects and increases cisplatin resistance in tongue squamous cell carcinoma cells by dysregulating Hippo signal pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 33(4), 352–361. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001269>
- Guo, G., von Meyenn, F., Rostovskaya, M., Clarke, J., Dietmann, S., Baker, D., Sahakyan, A., Myers, S., Bertone, P., Reik, W., Plath, K., & Smith, A. (2017). Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development (Cambridge)*, 144(15), 2748–2763. <https://doi.org/10.1242/dev.146811>
- Hajdu, S. I. (2011). A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097–1102. <https://doi.org/10.1002/CNCR.25553>
- Han, H., Huang, Z., Xu, C., Seo, G., An, J., Yang, B., Liu, Y., Lan, T., Yan, J., Ren, S., Xu, Y., Xiao, D., Yan, J. K., Ahn, C., Fishman, D. A., Meng, Z., Guan, K. L., Qi, R., Luo, R., & Wang, W. (2024). Functional annotation of the Hippo pathway somatic mutations in human cancers. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54480-y>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, *34*(10), 1514–1521. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00228-7)
- Hardy, P. A., & Zacharias, H. (2005). Reappraisal of the Hanseemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors. *Cell Biology International*, *29*(12), 983–992. <https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2005.10.001>
- Hayat, R., Manzoor, M., & Hussain, A. (2022). Wnt signaling pathway: A comprehensive review. In *Cell Biology International* (Vol. 46, Issue 6, pp. 863–877). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cbin.11797>
- Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6028), 458. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1199010>
- Hose, J., Yong, C. M., Sardi, M., Wang, Z., Newton, M. A., & Gasch, A. P. (2015). Dosage compensation can buffer copynumber variation in wild yeast. *ELife*, *4*(MAY). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.05462>
- Hosea, R., Hillary, S., Naqvi, S., Wu, S., & Kasim, V. (2024). The two sides of chromosomal instability: drivers and brakes in cancer. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01767-7>
- Ippolito, M. R., Martis, V., Martin, S., Tijhuis, A. E., Hong, C., Wardenaar, R., Dumont, M., Zerbib, J., Spierings, D. C. J., Fachinetti, D., Ben-David, U., Foijer, F., & Santaguida, S. (2021). Gene copy-number changes and chromosomal instability induced by aneuploidy confer resistance to chemotherapy. *Developmental Cell*, *56*(17), 2440–2454.e6. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.07.006>
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(22), 14298. <https://doi.org/10.1073/PNAS.162491399>

- Ishikawa, K., Makanae, K., Iwasaki, S., Ingolia, N. T., & Moriya, H. (2017). Post-Translational Dosage Compensation Buffers Genetic Perturbations to Stoichiometry of Protein Complexes. *PLoS Genetics*, *13*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006554>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D. H., Mitter, R., Rosenthal, R., Salm, M., Horswell, S., Escudero, M., Matthews, N., Rowan, A., Chambers, T., Moore, D. A., Turajlic, S., Xu, H., ... Swanton, C. (2017). Tracking the Evolution of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *376*(22), 2109–2121. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA1616288/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1616288\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1616288/SUPPL_FILE/NEJMOA1616288_DISCLOSURES.PDF)
- Jassim, A., Rahrmann, E. P., Simons, B. D., & Gilbertson, R. J. (2023). Cancers make their own luck: theories of cancer origins. *Nature Reviews Cancer*, *23*(10), 710–724. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00602-5>
- Joel, S. P., Shah, R., & Slevin, M. L. (1994). Etoposide dosage and pharmacodynamics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *34*(1 Supplement), 27–30. <https://doi.org/10.1007/BF00684867>
- Keating, P., Cambrosio, A., Nelson, N. C., Mogoutov, A., & Cointet, J. P. (2013). Therapy’s shadow: A short history of the study of resistance to cancer chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, *4* MAY, 42120. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2013.00058/ABSTRACT>
- Killcoyne, S., Yusuf, A., & Fitzgerald, R. C. (2021). Genomic instability signals offer diagnostic possibility in early cancer detection. *Trends in Genetics*, *37*(11), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.009>
- Kim, J. Y., Cho, Y. E., & Park, J. H. (2015). The Nucleolar Protein GLTSCR2 Is an Upstream Negative Regulator of the Oncogenic Nucleophosmin-MYC Axis. *The American Journal of Pathology*, *185*(7), 2061–2068. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2015.03.016>
- Kim, S., Han, Y., Kim, S. I., Kim, H. S., Kim, S. J., & Song, Y. S. (2018). Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. *Npj Precision Oncology* *2018* *2*:1, *2*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0063-0>
- Kojima, S., & Cimini, D. (2019). Aneuploidy and gene expression: Is there dosage compensation? *Epigenomics*, *11*(16), 1827–1837. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0135>

- Kolodner, R. D. (1995). Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 397–401. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89087-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89087-8)
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2006). GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell*, 127(5), 1041. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.09.048>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-3-R25/TABLES/5>
- Li, N., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5965), 542–545. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1180794>
- Li, T. K., & Liu, L. F. (2003). Tumor Cell Death Induced by Topoisomerase-Targeting Drugs. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Pharmtox.41.1.53*, 41, 53–77. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.41.1.53>
- Li, Y., Roberts, N. D., Wala, J. A., Shapira, O., Schumacher, S. E., Kumar, K., Khurana, E., Waszak, S., Korbil, J. O., Haber, J. E., Imielinski, M., Weischenfeldt, J., Beroukhir, R., Campbell, P. J., Akdemir, K. C., Alvarez, E. G., Baez-Ortega, A., Boutros, P. C., Bowtell, D. D. L., ... Zhang, C. Z. (2020). Patterns of somatic structural variation in human cancer genomes. *Nature*, 578(7793), 112–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1913-9>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT656>
- Lipsick, J. S., & Wang, D. M. (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene*, 18(19), 3047–3055. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1202745>
- Loh, Y. N., Hedditch, E. L., Baker, L. A., Jary, E., Ward, R. L., & Ford, C. E. (2013). The Wnt signalling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-174>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287–294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Molecular Cell*, *18*(3), 331–342. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.03.025>
- Lukong, K. E. (2017). Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clinical*, *7*, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.01.001>
- Lukow, D. A., Sausville, E. L., Suri, P., Chunduri, N. K., Wieland, A., Leu, J., Smith, J. C., Girish, V., Kumar, A. A., Kendall, J., Wang, Z., Storchova, Z., & Sheltzer, J. M. (2021). Chromosomal instability accelerates the evolution of resistance to anti-cancer therapies. *Developmental Cell*, *56*(17), 2427–2439.e4. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.07.009>
- Ma, S., Meng, Z., Chen, R., & Guan, K.-L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu. Rev. Biochem.*, *18*, 577–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118>
- Maneechotesuwan, K., Xin, Y., Ito, K., Jazrawi, E., Lee, K.-Y., Usmani, O. S., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2007). Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38 MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3. *The Journal of Immunology*, *178*(4), 2491–2498. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.4.2491>
- Man-Sai, A., Francisco, S. C., & Mora-Rodriguez, R. A. (2016). A biocomputational platform for the automated construction of large-scale mathematical models of miRNA-transcription factor networks for studies on gene dosage compensation. *2016 IEEE 36th Central American and Panama Convention, CONCAPAN 2016*. <https://doi.org/10.1109/CONCAPAN.2016.7942348>
- Margolis, R., Lohez, O., & Andreassen, P. (2002). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *88*(4), 673–683. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2495>
- Mayo Clinic Staff. (2022). *Cancer*. MayoClinic.Org. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syc-20370588#:~:text=Cancer refers to any one,of death in the world.>
- McPhail, S., Swann, R., Johnson, S. A., Barclay, M. E., Abd Elkader, H., Alvi, R., Barisic, A., Bucher, O., Clark, G. R. C., Creighton, N., Danckert, B., Denny, C. A., Donnelly, D. W., Dowden, J. J., Finn, N., Fox, C. R., Fung, S., Gavin, A. T., Gomez Navas, E., ... You, H. (2022). Risk factors

- and prognostic implications of diagnosis of cancer within 30 days after an emergency hospital admission (emergency presentation): an International Cancer Benchmarking Partnership (ICBP) population-based study. *The Lancet. Oncology*, 23(5), 587. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00127-9)
- Mehta, A., Awah, C. U., & Sonabend, A. M. (2018). Topoisomerase II poisons for glioblastoma; Existing challenges and opportunities to personalize therapy. *Frontiers in Neurology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00459>
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 502–513. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.01.067>
- Mohanty, V., Wang, F., Mills, G. B., & Chen, K. (2021). Uncoupling of gene expression from copy number presents therapeutic opportunities in aneuploid cancers. *Cell Reports Medicine*, 2(7). <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2021.100349/ATTACHMENT/59765FA8-465C-4269-A28A-A498DF0B05F5/MMC2.PDF>
- Montecucco, A., & Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*, 252(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.005>
- Motavalli, R., Majidi, T., Pournak, T., Abediazar, S., Shoja, M. M., Zununi Vahed, S., & Etemadi, J. (2021). The clinical significance of the glucocorticoid receptors: Genetics and epigenetics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 213. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2021.105952>
- Mukai, S., Yabuta, N., Yoshida, K., Okamoto, A., Miura, D., Furuta, Y., Abe, T., & Nojima, H. (2015). Lats1 suppresses centrosome overduplication by modulating the stability of Cdc25B. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16173>
- National Cancer Institute. (2011). *What Is Cancer?* Cancer.Gov. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Niehrs, C., & Acebron, S. P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *The EMBO Journal*, 31(12), 2705–2713. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.124>
- Nitiss, J. L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews. Cancer*, 9(5), 327. <https://doi.org/10.1038/NRC2608>

- Ozery-Flato, M., Linhart, C., Trakhtenbrot, L., Izraeli, S., & Shamir, R. (2011). Large-scale analysis of chromosomal aberrations in cancer karyotypes reveals two distinct paths to aneuploidy. *Genome Biology*, *12*(6), R61. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r61>
- Pai, S., Lewandowski, R., & Borgaonkar, D. (2002). *Handbook of chromosomal syndroms* (p. 376). Wiley-Liss.
- Paul, S., Home, P., Bhattacharya, B., & Ray, S. (2017). GATA factors: Master regulators of gene expression in trophoblast progenitors. *Placenta*, *60*(Suppl 1), S61. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2017.05.005>
- Pavelka, N., Rancati, G., Zhu, J., Bradford, W. D., Saraf, A., Florens, L., Sanderson, B. W., Hattem, G. L., & Li, R. (2010). Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature*, *468*(7321), 321–325. <https://doi.org/10.1038/nature09529>.Aneuploidy
- Peters, J. M., Shah, Y. M., & Gonzalez, F. J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*, *12*(3), 181–195. <https://doi.org/10.1038/nrc3214>
- Petrof, G., Nanda, A., Howden, J., Takeichi, T., McMillan, J. R., Aristodemou, S., Ozoemena, L., Liu, L., South, A. P., Pourreyron, C., Dafou, D., Proudfoot, L. E., Al-Ajmi, H., Akiyama, M., Irwin McLean, W. H., Simpson, M. A., Parsons, M., & McGrath, J. A. (2014). Mutations in GRHL2 result in an autosomal-recessive ectodermal Dysplasia syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *95*(3), 308–314. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2014.08.001>
- Picado, O., Bispo, J. B., Bouzoubaa, L., Balise, R. R., Lopes, G., & Kobetz, E. N. (2018). Cancer patterns and trends in Costa Rica: A population-based tumor registry study. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.E13605](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.E13605), *36*(15\_suppl), e13605–e13605. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_SUPPL.E13605](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_SUPPL.E13605)
- Qiang, Z., Jubber, I., Lloyd, K., Cumberbatch, M., & Griffin, J. (2023). Gene of the month: GATA3. *Journal of Clinical Pathology*, *76*(12), 793–797. <https://doi.org/10.1136/jcp-2023-209017>
- Ramsay, R. G., & Gonda, T. J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 8, Issue 7, pp. 523–534). <https://doi.org/10.1038/nrc2439>
- Replogle, J. M., Zhou, W., Amaro, A. E., McFarland, J. M., Villalobos-Ortiz, M., Ryan, J., Letai, A., Yilmaz, O., Sheltzer, J., Lippard, S. J., Ben-David, U., & Amon, A. (2020). Aneuploidy increases resistance to chemotherapeutics by antagonizing cell division. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(48), 30566–30576.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.2009506117/SUPPL\\_FILE/PNAS.2009506117.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.2009506117/SUPPL_FILE/PNAS.2009506117.SAPP.PDF)
- Santaguida, S., Vasile, E., White, E., & Amon, A. (2015). Aneuploidy-induced cellular stresses limit autophagic degradation. *Genes & Development*, 29(19), 2010.  
<https://doi.org/10.1101/GAD.269118.115>
- Savage, J. (1975). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 12(2), 103–122. <https://doi.org/10.1136/jmg.13.2.103>
- Savage, J. (1999). An introduction to chromosomal aberrations. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 3(2), 110–115. <https://doi.org/10.4267/2042/37524>
- Schukken, K. M., & Sheltzer, J. M. (2022). Extensive protein dosage compensation in aneuploid human cancers. *Genome Research*, 32(7), 1254–1270.  
<https://doi.org/10.1101/GR.276378.121/-/DC1>
- Selmecki, A. M., Dulmage, K., Cowen, L. E., Anderson, J. B., & Berman, J. (2009). Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLoS Genetics*, 5(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000705>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498.  
<https://doi.org/10.1101/GR.1239303>
- Shao, X., Lv, N., Liao, J., Long, J., Xue, R., Ai, N., Xu, D., & Fan, X. (2019). Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: A pan-cancer study. *BMC Medical Genetics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0909-5>
- Sheltzer, J., & Amon, A. (2011). The Aneuploidy Paradox: Costs and Benefits of an Incorrect Karyotype. *Trends Genet.*, 27(11), 446–453. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tig.2011.07.003>
- Sheltzer, J., Ko, J., Replogle, J., Habibe Burgos, N., Chung, E., Meehl, C., Sayles, N., Passerini, V., Storchova, Z., & Amon, A. (2017). Single-chromosome Gains Commonly Function as Tumor Suppressors. *Cancer Cell*, 31(2), 240–255. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.12.004>
- Sheltzer, J. M., Torres, E. M., Dunham, M. J., & Amon, A. (2012). Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12644–12649.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.1209227109/SUPPL\\_FILE/SD01.XLSX](https://doi.org/10.1073/PNAS.1209227109/SUPPL_FILE/SD01.XLSX)

- Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:10, 6(10), 813–823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
- Song, P., Gao, Z., Bao, Y., Chen, L., Huang, Y., Liu, Y., Dong, Q., & Wei, X. (2024). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in carcinogenesis and cancer therapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01563-4>
- Sorenson, C. M., & Eastman, A. (1988a). Influence of cis-diamminedichloroplatinum(u) on dna synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese hamster ovary cells. *Cancer Research*, 48(23), 6703–6707.
- Sorenson, C. M., & Eastman, A. (1988b). Mechanism of cw-Diamminedichloroplatinum ( II ) - induced Cytotoxicity : Role of G2. *Cancer Research*, 48(16), 4484–4488.
- Stingele, S., Stoehr, G., Peplowska, K., Cox, J., Mann, M., & Storchova, Z. (2012). Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Molecular Systems Biology*, 8. <https://doi.org/10.1038/MSB.2012.40>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Talevich, E., Shain, A. H., Botton, T., & Bastian, B. C. (2016). CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Computational Biology*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004873>
- Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Furuhashi, H., Irie, R., Nishikawa, M., Yamamoto, J., Hibi, T., Miura, S., Minamino, T., Oike, Y., Hokari, R., & Kanai, T. (2018). Aortic carboxypeptidase-like protein, a WNT ligand, exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1581–1596. <https://doi.org/10.1172/JCI92863>
- Thompson, D. S., Greco, F. A., Miller, A. A., Srinivas, N. R., Igwemezie, L. N., Hainsworth, J. D., Lee, P. S., Kaul, S., Barbhaiya, R. H., Garrow, G. C., & Hande, K. R. (1995). A phase I study of etoposide phosphate administered as a daily 30-minute infusion for 5 days. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 57(5), 499–507. [https://doi.org/10.1016/0009-9236\(95\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0009-9236(95)90034-9)
- Torres, E. M., Sokolsky, T., Tucker, C. M., Chan, L. Y., Boselli, M., Dunham, M. J., & Amon, A. (2007). Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science*, 317(5840), 916–924. <https://doi.org/10.1126/science.1142210>

- Turajlic, S., & Swanton, C. (2016). Metastasis as an evolutionary process. *Science*, *352*(6282), 169–175. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2784>
- Upadhyay, A. (2021). Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes and Diseases*, *8*(5), 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>
- Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2018). The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. In *Cancers* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers10010004>
- Vasudevan, A., Schukken, K. M., Sausville, E. L., Girish, V., Adebambo, O. A., & Sheltzer, J. M. (2021). Aneuploidy as a promoter and suppressor of malignant growth. *Nature Reviews Cancer*, *21*(2), 89–103. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00321-1>
- Veitia, R. A., Bottani, S., & Birchler, J. A. (2008). Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends in Genetics : TIG*, *24*(8), 390–397. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2008.05.005>
- Vilain, N., Tsai-Pflugfelder, M., Benoit, A., Gasser, S. M., & Leroy, D. (2003). Modulation of drug sensitivity in yeast cells by the ATP-binding domain of human DNA topoisomerase II $\alpha$ . *Nucleic Acids Research*, *31*(19), 5714. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG737>
- Wagner, N., & Wagner, K. D. (2020). PPAR Beta/Delta and the Hallmarks of Cancer. *Cells*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/CELLS9051133>
- Wan, Y. Y. (2014). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology*, *35*(6), 233–242. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2014.04.002>
- Wang, R., Li, J., Zhou, X., Mao, Y., Wang, W., Gao, S., Wang, W., Gao, Y., Chen, K., Yu, S., Wu, X., Wen, L., Ge, H., Fu, W., & Tang, F. (2022). Single-cell genomic and transcriptomic landscapes of primary and metastatic colorectal cancer tumors. *Genome Medicine*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/S13073-022-01093-Z>
- Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Current Opinion in Cell Biology*, *18*(6), 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.002>
- WHO. (2020). *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240001299>
- Xiao, Y., & Dong, J. (2021). The hippo signaling pathway in cancer: A cell cycle perspective. *Cancers*, *13*(24). <https://doi.org/10.3390/cancers13246214>

- Xu, X., Zhang, M., Xu, F., & Jiang, S. (2020). Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular Cancer*, *19*(1), 165. <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01276-5>
- Yousefi, H., Delavar, M. R., Piroozian, F., Baghi, M., Nguyen, K., Cheng, T., Vittori, C., Worthylake, D., & Alahari, S. K. (2022). Hippo signaling pathway: A comprehensive gene expression profile analysis in breast cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 151). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113144>
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, *36*(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/ONC.2016.304>
- Zhang, S., Zhou, K., Luo, X., Li, L., Tu, H. C., Sehgal, A., Nguyen, L. H., Zhang, Y., Gopal, P., Tarlow, B. D., Siegwart, D. J., & Zhu, H. (2018). The Polyploid State Plays a Tumor-Suppressive Role in the Liver. *Developmental Cell*, *44*(4), 447-459.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.01.010>
- Zhang, X., & Yu, X. (2023). Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and DNA damage response in cancer: a new direction for overcoming therapy resistance. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1230822>
- Zhang, Z. M., Wu, J. F., Luo, Q. C., Liu, Q. F., Wu, Q. W., Ye, G. D., She, H. Q., & Li, B. A. (2016). Pygo2 activates MDR1 expression and mediates chemoresistance in breast cancer via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncogene*, *35*(36), 4787–4797. <https://doi.org/10.1038/ONC.2016.10>
- Zhao, B., Xin, Z., Ren, P., & Wu, H. (2023). The Role of PPARs in Breast Cancer. In *Cells* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12010130>
- Zhao, Y., & Yang, X. (2015). The Hippo pathway in chemotherapeutic drug resistance. *International Journal of Cancer*, *137*(12), 2767–2773. <https://doi.org/10.1002/IJC.29293>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con cisplatino 6  $\mu$ M.

A4GNT	C5orf30	CYP7B1	GCNT7	IMPG2	MAP3K1
AARD	C5orf47	CYS1	GDF9	INHA	MAST1
AC008575.1	C7orf33	DDX53	GGN	IQC�	MCCC1
AC008691.1	C8B	DHDDS	GGTLC2	ISL1	MEIG1
AC011525.1	C8orf33	DNAJB9	GIN1	ITGA9	MFSD6L
AC025171.1	C8orf88	DNAJC19	GJA10	ITPRIP	MICOS10-NBL1
ADA	CALB1	DNASE2	GJA5	IZUMO1R	MKKS
ADAM30	CARD18	DNTTIP2	GK2	JPH1	MMP16
ADNP2	CARD6	DOK2	GLYAT	JRKL	MMP20
AGL	CASTOR2	DPH3	GNG7	KBTBD3	MPEG1
AIPL1	CATSPER3	DPYSL3	GNMT	KCNA10	MPLKIP
AK4	CAV2	DRD1	GNRH1	KCNA3	MRGPRF
AKIRIN1	CCDC126	DSC3	GOLPH3	KCNA5	MRPL13
AKR1D1	CCDC8	DUSP26	GOPC	KCNB1	MRPS33
AL033529.1	CCDC87	EFEMP2	GPAA1	KCNK6	MSGN1
AMIGO1	CCIN	EID2B	GPIHBP1	KHDC3L	MSL2
ANGPTL4	CCL7	EIF3H	GPR157	KIF4B	MTERF3
ANKRD20A8P	CCNO	EIF4EBP1	GRHL2	KLF15	NATD1
ANKRD33B	CCT8L2	ELP2	GRM7	KLHL9	NCALD
ANKRD46	CDA	EMB	GSS	KLK4	NCF4
AP4B1	CDK4	EPM2AIP1	GTF2E1	KLK5	NDUFA8
AP5B1	CENPB	ERICH5	GTSF1L	KRTAP11-1	NDUFAF6
APLN	CFAP53	EXOC3	H3F3C	KRTAP13-2	NEFM
APOC3	CHAMP1	FAM182B	HBD	KRTAP13-4	NLRP11
APOD	CHRAC1	FAM200A	HESX1	KRTAP19-2	NME5
ARFRP1	CHRNA2	FAM210A	HGD	KRTAP19-3	NMNAT1
ARL14	CHST1	FAM83A	HGH1	KRTAP19-4	NR3C1
ARL6	CHST6	FAM89A	HIPK4	KRTAP19-6	NRSN2
ATP13A4	CHSY3	FAM90A1	HIST1H2BL	KRTAP21-3	NUDT16L1
ATP6V1C1	CLDN19	FASTKD2	HIST1H3G	KRTAP27-1	NUDT18
ATXN7L3B	CLDN8	FBN2	HIST1H3H	KRTAP5-11	NUDT8
BARD1	COA5	FBXO43	HIST1H4I	KRTAP6-2	NUFIP2
BBS10	COL8A1	FEM1A	HOXA13	KRTAP7-1	ORC6
BBS12	COX7B2	FEM1C	HOXC13	L1TD1	OSGEPL1
BLID	CPA3	FHL3	HOXD1	LCE3A	OSGIN2

BMP7	CPB1	FKBP1C	HSBP1L1	LIPT2	OTUD6B
BMPR2	CPN2	FN3K	HSPB3	LNP1	OTULIN
BPGM	CRYGS	FOLR2	IDH3B	LRRC25	OXCT1
BTG4	CSGALNACT1	FOXI3	IFNA14	LRRC4C	OXSM
C10orf99	CSMD3	FOXRED1	IFNA8	LRRC69	PARD6B
C12orf57	CSNK1G3	FZD1	IGIP	LSM10	PARD6G
C1orf210	CSRNP1	FZD2	IL23R	LSM11	PARS2
C2orf88	CSRP3	GAL3ST4	IL7	LUZP1	PATE3
C3orf35	CYP7A1	GALP	IMPA1	LVRN	PCBD1

**Anexo 1.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con cisplatino 6  $\mu$ M (continuación).

PDCD10	RIDA	SYCE2	UPB1	ZNF644
PDP1	RIMS3	SYCE3	UTP23	ZNF665
PECAM1	RIPPLY3	SYNGR4	VANGL1	ZNF699
PECR	RMDN1	SYNPO	VCPIP1	ZNF706
PEX1	RNF170	TACSTD2	WASHC5	ZNF729
PEX2	RNF19A	TAF11	WNT10A	ZNF736
PGBD2	ROMO1	TAF13	WNT2	ZNF77
PHF13	ROPN1L	TAF2	WNT4	ZNF792
PIGZ	RPAP2	TAL2	XRCC2	ZNF793
PIK3CD	RPARP-AS1	TAMM41	YIPF5	
PITX1	RPE65	TCF24	YTHDF1	
PKDREJ	RPL23AP49	TES	ZBED4	
PLAAT2	RPL39L	TG	ZBED5	
PLAC8L1	RSPO2	THAP8	ZBTB21	
PNMA8A	RSPO4	THSD7A	ZC3HAV1L	
POLR2K	RTN4R	TIGD6	ZFP3	
POLR3D	RTN4RL2	TIGIT	ZHX1-C8orf76	
PON2	S100B	TKTL2	ZHX2	
POP1	SCRG1	TLCD3A	ZNF132	
PPBP	SEC22A	TLR5	ZNF16	
PPIAL4A	SEMA3E	TM4SF18	ZNF224	
PPP1R35	SH3BP5L	TMEM100	ZNF256	
PPP1R42	SHLD1	TMEM126A	ZNF296	
PRDM14	SIAH2	TMEM138	ZNF329	
PRND	SIL1	TMEM14A	ZNF337	
PROCR	SLC17A3	TMEM225B	ZNF345	
PRR9	SLC26A4-AS1	TMEM270	ZNF354C	
PRSS12	SLC39A13	TMEM53	ZNF420	
PYDC2	SLC44A5	TMEM61	ZNF425	
PYGM	SLC45A2	TMEM64	ZNF430	
QTRT2	SLCO5A1	TMEM70	ZNF471	
RAB38	SMAD2	TMEM89	ZNF502	
RAB6B	SMIM12	TPRG1	ZNF513	
RAD51C	SMIM20	TRIM55	ZNF527	
RAET1L	SNX16	TRIM56	ZNF549	
RANBP6	SOX14	TRNT1	ZNF556	

RAP2B	SPATA45	TSHZ3	ZNF558
RBM15B	SPR	TSPAN12	ZNF572
RBP7	SPTSSB	TTC9B	ZNF574
RCC1L	SSBP1	TTPA	ZNF575
RDH10	STAR	TWISTNB	ZNF594
REG4	STX11	TYMP	ZNF596
REM1	SUOX	UBE2D2	ZNF616
RFLNB	SUSD5	UMPS	ZNF621

**Anexo 2.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con cisplatino 8  $\mu$ M.

AARD	C5orf30	CSRNP1	FBXO43	HOXC13	L1TD1
ABHD10	C5orf47	CSTF3	FBXO48	HSPB3	LACTB2
ABRACL	C5orf52	CTAGE1	FEM1A	ID2	LCE3A
AC008691.1	C7orf33	CTNNB1	FEM1C	IFNA14	LGB3
AC011525.1	C9orf116	CTNNBIP1	FGG	IFNA8	LINC02693
AC025171.1	CA2	CTRB2	FIZ1	IGFBP1	LIPT2
AC084125.2	CA3	CXCR5	FN3K	IGIP	LMO2
AC097460.1	CALB1	CYP11B2	FNDC7	IL23R	LNP1
ADA	CARD6	CYP7B1	FOXRED1	IMPA1	LPL
ADAM30	CASTOR2	DBP	FZD1	IMPG2	LRRC25
AGK	CATSPER3	DDX53	FZD2	INHA	LRRC42
AGL	CAVIN2	DERL1	GABRP	ITGA9	LSM10
AL033529.1	CBWD2	DHDDS	GDF9	ITPRIP	LUZP1
ALDH1B1	CCDC126	DLX5	GGN	JPH1	LYPD2
AMIGO1	CCDC50	DMRT1	GIMAP4	JRKL	LYPD5
ANGPTL4	CCDC8	DNAAF1	GJA5	KBTBD2	MAP3K1
ANKRD33B	CCDC87	DNASE2	GK2	KBTBD3	MARCKS
ANKRD46	CCIN	DNTTIP2	GLYAT	KCNA10	MAST1
ANKRD49	CD14	DPH3	GM2A	KCNA3	MCCC1
AP000662.1	CD52	DPY19L4	GNA12	KCNA5	MCMDC2
AP001636.3	CD58	DR1	GNG7	KCNF1	MFSD6L
AP4B1	CD86	DRD1	GNRH1	KCNK6	MISP
APOC3	CDA	DUSP3	GOLPH3	KCNMB3	MISP3
APOD	CDH17	EBAG9	GPIHBP1	KCTD9	MKKS
ARF4	CDK4	ECI1	GPR157	KDM4D	MMP13
ARHGEF5	CDKN2AIPNL	EEFSEC	GPR37	KHDC1	MPLKIP
ARL14	CEBPG	EFCAB10	GPT	KIF4B	MRFAP1L1
ARL6	CHRN3	EIF2B3	GRHL2	KLF15	MRPL13
ARMC1	CHST13	EOMES	GSDME	KLHL26	MS4A13
ATG4C	CHST6	EPM2AIP1	GSS	KLHL9	MSL2
ATP13A4	CLDN19	ERAP1	GTF2E1	KRT17	MTERF3
ATP6V1C1	CNN3	ERICH5	GTPBP3	KRTAP11-1	NACA2
ATXN7L3B	COA3	ESM1	H2AFJ	KRTAP13-4	NAIF1
BARD1	COL5A2	ETHE1	H3F3C	KRTAP19-1	NAT14
BBS12	COL8A1	EXTL2	HBD	KRTAP19-2	NCALD
BEND6	COQ9	FAM182B	HCRTR1	KRTAP19-3	NDST1
BLID	COX7B2	FAM200A	HESX1	KRTAP19-4	NDUFAF6

BMP7	CP	FAM20A	HGD	KRTAP19-6	NDUFAF8
BMPR2	CPA6	FAM210B	HGF	KRTAP19-7	NEFM
BPGM	CPT1A	FAM241A	HIPK4	KRTAP19-8	NEIL2
BRD3OS	CRYGS	FAM83A	HIST1H2BL	KRTAP21-3	NEURL1B
C1orf210	CSGALNACT1	FASTKD2	HIST1H3G	KRTAP6-2	NIPAL2
C20orf197	CSMD3	FBN2	HIST1H4I	KRTAP7-1	NR3C1
C2orf88	CSNK1G3	FBXO40	HOXA13	KRTAP8-1	NUDT18

**Anexo 2.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con cisplatino 8  $\mu$ M (continuación).

NUDT8	PYDC2	SEPTIN5	TIGIT	ZFHX4
ORAI1	QTRT2	SFN	TKTL2	ZFP28
OSGEPL1	RAB38	SHLD1	TLR5	ZFP3
OSGIN2	RAD54B	SIAH2	TLX2	ZHX1-C8orf76
OTUD6B	RAD54L	SIL1	TM4SF4	ZHX2
OTULIN	RANBP6	SLC14A1	TMED5	ZIK1
OXCT1	RAP2B	SLC17A3	TMEM203	ZNF132
OXSM	RAPSN	SLC25A19	TMEM213	ZNF260
PAR6B	RARRES1	SLC26A7	TMEM232	ZNF264
PAR6G	RBP7	SLC36A1	TMEM270	ZNF345
PARS2	RCC1L	SLC45A2	TMEM61	ZNF350
PATE3	RDH10	SLC05A1	TMEM64	ZNF354C
PECAM1	REM1	SLURP1	TMEM70	ZNF382
PECR	RFLNB	SMIM12	TP53RK	ZNF404
PERM1	RFT1	SNTB1	TRIM55	ZNF420
PEX1	RIMS3	SNX16	TSHZ3	ZNF441
PEX2	RMDN1	SNX31	TSPYL5	ZNF471
PFDN1	RNF11	SPATA45	TTC9B	ZNF491
PGBD2	RNF169	SPC24	TWIST2	ZNF501
PGP	RNF170	SPTSSB	TXN2	ZNF502
PIGZ	ROMO1	SRARP	TYMP	ZNF527
PIK3CG	ROPN1L	STARD4	UBE2D2	ZNF57
PITX1	RPARP-AS1	STC1	UMPS	ZNF572
PKDREJ	RPE65	STOX1	UPK1B	ZNF574
PLAAT2	RPL39L	STX11	USF3	ZNF575
PLAC8L1	RPN2	STX8	USP29	ZNF616
PLSCR4	RPRM	SUOX	UTP4	ZNF621
PNMT	RRAD	SUSD5	VANGL1	ZNF644
POLR2K	RSBN1L	SYCE2	VCPIP1	ZNF696
POLR2L	RSPH9	SYCE3	WASHC1	ZNF706
POLR3D	RSPO2	SYF2	WASHC5	ZNF729
PON2	RSPO4	SYNPO	WNT10A	ZNF736
POP1	RTN4R	TAC1	WNT2	ZNF77
POP7	RTN4RL2	TACSTD2	WNT4	ZNF786
PPIAL4A	RTP1	TAF11	XCL2	ZP3
PPP1R32	S100B	TBCCD1	YIF1A	

PPP1R42	SALL4	TCF24	YIPF1
PRDX5	SAMD9	TEKT2	YRDC
PRMT2	SAPCD2	TFEC	ZBED4
PROCR	SAR1B	TG	ZBED5
PRR5L	SBSPON	TGFBR3	ZBTB21
PRR9	SDC2	THAP8	ZBTB5
PRSS23	SEC22A	THG1L	ZC3H3
PTPRG-AS1	SEMA3E	TIGD6	ZC3HAV1L

**Anexo 3.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con etopósido 4  $\mu$ M.

AARD	BBS10	CHAMP1	DPY19L4	FTMT	HOXA13
AC008691.1	BBS12	CHMP4C	DRD1	FZD1	HOXC13
AC009163.5	BCL7B	CHST1	DSC3	FZD2	HSBP1
AC010319.2	BLID	CHST6	DTX4	GAGE2A	HSBP1L1
AC011525.1	BMP8A	CLDN19	DUSP23	GAL3ST4	HSPB3
AC025171.1	BMPR2	CLU	DUSP3	GCDH	ID2
AC036214.3	BOK	CNTN4	DYNLL2	GDF11	ID3
AC104532.1	BRD3OS	COA4	E2F1	GDF9	IFNA14
ACOT8	C10orf99	COA5	EBAG9	GEMIN4	IFNA8
ACVR2B	C17orf100	COL9A2	EID2B	GFER	IL18BP
ADA	C19orf73	COLEC10	EIF1AD	GGTLC2	IL7
ADAM30	C1orf210	COX10	EIF2B3	GHR	IMPG2
ADM5	C1orf52	COX6B1	EIF3H	GJA1	INHA
ADRA1A	C2orf72	COX6C	EIF5A2	GJA10	IQCB1
AGK	C2orf88	COX7B2	ENPP4	GK2	IQCN
AGL	C3orf35	CPA6	EOMES	GLB1	IQUB
AHCY	C5orf24	CPT1A	EPM2AIP1	GLMN	IRGC
AIPL1	C5orf30	CRISPLD1	ERBB4	GLYAT	ITGA9
ALG14	C5orf47	CRYBA2	ERFE	GM2A	ITPRIP
ALG6	C5orf58	CRYGS	ESM1	GMNC	JPH1
ALX1	C7orf33	CSGALNACT1	EVA1A	GNG7	JRKL
AMACR	C8orf33	CSMD3	EXTL3	GNRH1	KBTBD3
AMH	CA13	CSRNP1	FA2H	GOLPH3	KCNA10
AMIGO1	CA3	CSRP3	FABP7	GPAA1	KCNA3
ANGPT1	CALB1	CST3	FAM200A	GPIHBP1	KCNA5
ANKRD33B	CARD6	CTHRC1	FAM210B	GPR83	KCNK6
ANKRD46	CATSPER3	CTNNBIP1	FAM241A	GRHL2	KIF26B
ANKRD50	CAVIN2	CTRB2	FAM3C	GSDME	KIF4B
AP3M2	CCDC126	CTRC	FAM83A	GTF2E1	KLF15
AP4B1	CCDC152	CTTNBP2NL	FAM89A	GTSF1L	KLHL36
APCDD1	CCDC87	CXADR	FBXO40	GYPC	KLHL9
APOC3	CCIN	CYBRD1	FBXO43	H3F3C	KRTAP11-1
AQP12B	CCL8	CYP7A1	FBXO46	HACD2	KRTAP13-3
AREG	CCN4	CYP7B1	FEM1A	HBD	KRTAP13-4
ARHGEF5	CCT8L2	DEDD2	FEM1C	HELLPAR	KRTAP19-1
ARL14	CD320	DGUOK	FGF18	HESX1	KRTAP19-2
ARL14EP	CD52	DHDDS	FITM2	HGF	KRTAP19-3

ARMC1	CD80	DHRS13	FIZ1	HGH1	KRTAP19-4
ARMC7	CD86	DLX5	FKBP1C	HIST1H2BL	KRTAP19-6
ASPHD2	CDA	DNAJB9	FKBP7	HIST1H3G	KRTAP20-4
ATP13A4	CDH18	DNAJC5	FKRP	HIST1H3H	KRTAP21-2
ATP5IF1	CDO1	DNASE2	FN3K	HIST1H4I	KRTAP21-3
ATXN7L3B	CENPB	DNTTIP2	FNDC11	HMCE5	KRTAP22-2
B3GAT3	CFAP53	DOK2	FTL	HMGCL	KRTAP26-1

**Anexo 3.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con etopósido 4  $\mu$ M (continuación).

KRTAP6-2	NEIL2	PTTG1	SIL1	TM2D2	ZFAND1
KRTAP7-1	NFS1	PYDC2	SLC17A3	TMCO2	ZFAT
L1TD1	NR3C1	PYURF	SLC25A19	TMEM126A	ZFP3
LACTB2	NUDT18	QTRT2	SLC25A46	TMEM135	ZFP36L2
LCE3A	NXT1	RAB23	SLC26A4-AS1	TMEM138	ZHX1-C8orf76
LEAP2	ORC6	RAB38	SLC27A6	TMEM14A	ZHX2
LIN28A	OTUD6B	RAD54B	SLC2A10	TMEM213	ZMAT3
LIN7C	OXCT1	RAE1	SLC35B2	TMEM61	ZNF132
LIPT2	OXSM	RANBP6	SLC45A2	TMEM64	ZNF16
LPL	PANX1	RAP2B	SLC48A1	TMEM70	ZNF211
LRRC25	PARD6G	RASL10A	SLC6A19	TMPRSS11F	ZNF212
LRRCC1	PARS2	RBAK-RBAKDN	SLCO5A1	TRNT1	ZNF224
LSM10	PCBD1	RDH10	SMCR8	TSHZ3	ZNF227
LSM11	PCMTD1	REM1	SMIM12	TSPAN12	ZNF256
LSM3	PECR	RFLNB	SNTB1	TSPYL5	ZNF260
LTC4S	PERM1	RFT1	SNX16	TTI1	ZNF324
LYPD5	PEX1	RHOG	SPAAR	TWIST2	ZNF329
MACC1	PEX14	RIDA	SPATA45	TXN2	ZNF354C
MAP3K1	PEX2	RIMS3	SPR	TYMP	ZNF382
MAPK8IP2	PGBD2	RIPK2	SPTSSB	UBTD1	ZNF404
MARCH11	PIGZ	RMDN1	STAR	UCP3	ZNF420
MARCH3	PINK1	RNF152	STOX1	UPB1	ZNF441
MAST1	PITX1	RNF170	SUOX	UTP4	ZNF460
MCCC1	PKDREJ	RPAP2	SURF1	VANGL1	ZNF491
MCMDC2	PKIA	RPE65	SYDE2	VCPIP1	ZNF527
MED10	PLA2G5	RPL37	SYNE4	VKORC1L1	ZNF556
METTL27	PLAAT2	RPL39L	SYNPO	VPS28	ZNF572
MFSD6L	PLAGL2	RSPO2	TACSTD2	VPS29	ZNF574
MPEG1	PLIN4	RSPO4	TAF11	WASHC5	ZNF575
MPLKIP	PLSCR4	RTN4R	TAF13	WFDC1	ZNF594
MRFAP1L1	PNMT	RTN4RL2	TAMM41	WFDC2	ZNF596
MRGPRF	POLR2K	S100A6	TBCCD1	WFDC5	ZNF616
MRM3	PON2	SALL4	TCF24	WNT10A	ZNF644
MRPL13	POP1	SAMD9	TCIM	WNT2	ZNF667
MRPL54	POP7	SAMD9L	TEKT2	WNT4	ZNF705G
MRPS2	PPARA	SBSPON	TES	YJU2	ZNF706

MRPS25	PPARD	SCG2	TEX19	ZAR1	ZNF729
MRPS33	PPIAL4A	SCRG1	TG	ZBED4	ZNF736
MSL2	PPP1R32	SDF2	THAP8	ZBED5	ZNF846
MTERF3	PRMT2	SDR42E1	TIGD6	ZBTB21	ZSCAN25
NBPF20	PRR9	SEC22A	TIGIT	ZBTB5	
NCF4	PRSS23	SEC22B	TKTL2	ZC2HC1A	
NDST1	PTDSS1	SEMA3E	TLCD3A	ZCCHC24	
NDUFAF6	PTDSS2	SHLD1	TLR5	ZDHHC18	
NEFM	PTGIS	SIAH2	TLR7	ZDHHC24	

**Anexo 4.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con etopósido 6  $\mu$ M.

AARD	BBS12	CLDN19	FAM241A	IFNA14	LINC02693
AC008691.1	BIRC8	CLDN3	FAM90A1	IFNA6	LMO2
AC012254.2	BLID	CLDN8	FBXO40	IFNA8	LRRC25
AC012313.3	BMPR2	CLDN9	FBXO43	IGFBP7	LRRC38
AC025171.1	BOP1	COA4	FBXO45	IGIP	LRRC47
AC104532.1	BPGM	COL8A1	FBXO46	IL7	LRRC61
ACOT13	BRD3OS	COP55	FEM1A	INA	LRRC75A
ACTL9	BUD31	COX7B2	FGG	INHA	LRRIQ3
ACTRT2	C17orf100	CP	FHIT	IQCEN	LSM10
ACVR2B	C17orf67	CPA6	FITM2	ITPRIP	LSM11
ADA	C18orf21	CPOX	FIZ1	JAGN1	LSM3
ADAM30	C1orf115	CPTP	FTL	JRKL	LUZP1
ADM5	C1orf210	CRISPLD1	FUT10	KBTBD3	LY6D
AGL	C1orf53	CRYGS	FZD1	KBTBD6	MALSU1
AHCY	C1QA	CSGALNACT1	FZD2	KCNA10	MAP3K1
AICDA	C2orf88	CST2	FZD6	KCNA3	MAST1
AIP1	C3orf70	CSTA	GAGE2A	KCNA5	MBD3L1
AL033529.1	C5orf24	CTH	GAL3ST4	KCNB1	MICU3
AL160272.2	C5orf30	CTHRC1	GDF3	KCNB2	MMUT
ALDH1B1	C8orf88	CTNNB1	GDF9	KCNF1	MPLKIP
ALG14	CALHM3	CTNNBIP1	GEMIN4	KCNMB3	MRFAP1L1
ALG6	CALHM4	CXCL6	GGN	KIAA1143	MRGBP
AMH	CALU	CYBRD1	GLMN	KIF4B	MRNIP
AMIGO1	CARD6	CYP7A1	GLYAT	KLF15	MRPL44
ANKRD33B	CATSPER3	CYP7B1	GMNC	KLHDC8B	MRPS25
ANKRD46	CCDC126	DHDDS	GPR148	KLHL26	MRPS26
ANKRD49	CCDC172	DHRS13	GPT	KLHL36	MRPS30
ANKRD50	CCDC71	DMAC1	GSS	KLHL9	MSGN1
AP4B1	CCDC8	DMRT1	GTF2E1	KRTAP11-1	MSR1
AP5B1	CCDC87	DNAJC5	GTSF1L	KRTAP13-2	MTERF3
APOC3	CCIN	DNASE2	GYPC	KRTAP13-4	MUL1
AQP12B	CCN4	DRD1	HACD2	KRTAP15-1	MYORG
AREG	CCNG1	EFHD2	HELLPAR	KRTAP19-4	MZF1-AS1
ARF6	CCT8L2	EID2B	HGF	KRTAP19-7	NACA2
ARHGEF5	CD52	EIF2B3	HGH1	KRTAP20-4	NAGS
ARL14EP	CD58	EMB	HIST1H2BL	KRTAP21-3	NANOS2
ARSI	CDA	EPM2AIP1	HIST1H3G	KRTAP22-2	NBPF20

ARX	CDKN2D	ERAP1	HIST4H4	KRTAP6-2	NCOA5
ASNSD1	CENPQ	ERICH5	HMX3	KRTAP7-1	NDUFB4
ATP5F1E	CETN1	ESM1	HOXA13	KRTAP8-1	NDUFS1
ATXN7L3B	CHAMP1	EXTL3	HOXC12	L1TD1	NECAB1
B4GALT7	CHST2	FAM111B	HOXC13	LACTB2	NEFM
BARD1	CHST6	FAM167A	HSDL1	LCE3A	NEIL2
BBS10	CILP2	FAM200A	HSPB3	LEAP2	NMU

**Anexo 4.** Lista de genes candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con etopósido 6  $\mu$ M (continuación).

NRARP	PPARA	SAMD9L	TLCD3A	ZKSCAN1
NRN1	PPIAL4A	SAR1B	TLR5	ZMAT5
NTSR1	PPP1R32	SBSPON	TLX2	ZNF256
NUDT8	PRLH	SCG2	TMED5	ZNF329
NUFIP2	PRMT2	SCGB3A2	TMEM126A	ZNF416
OLFML3	PROK1	SCRG1	TMEM178A	ZNF444
OPRD1	PRSS23	SEC22A	TMEM219	ZNF471
ORAI1	PSMG3	SELENOP	TMEM236	ZNF507
ORC1	PTGIR	SF3A2	TMEM258	ZNF527
OSGEPL1	PTGIS	SFN	TMEM270	ZNF536
OSM	RAB11B	SGTB	TMEM60	ZNF556
OST4	RAB23	SLC17A3	TMEM61	ZNF568
OTUD6B	RAB38	SLC26A4-AS1	TMEM64	ZNF574
OXL1D1	RAD54B	SLC2A10	TMEM68	ZNF583
OXSM	RANBP6	SLC35B2	TMEM70	ZNF594
PAR6D6B	RASD2	SLC36A4	TRIM55	ZNF596
PAR6D6G	RASL10A	SLC45A2	TRIM56	ZNF613
PARS2	RDH10	SLC9A9	TRMU	ZNF621
PBK	REM1	SMAD2	TSHZ3	ZNF644
PEBP4	RFLNB	SNX16	TSPAN12	ZNF696
PECAM1	RGMB	SNX18	TTC9B	ZNF699
PERM1	RGS17	SNX7	TUBB4A	ZNF706

PEX1	RHOB	SPATA2	TWIST2	ZNF729
PEX11G	RHOG	SPATA45	TXN2	ZNF736
PEX2	RIDA	SPR	TYW3	
PFN2	RIOX2	SRARP	UCP3	
PGBD2	RMDN1	STAR	USP29	
PGP	RNF168	STX11	VANGL1	
PGPEP1	RNF19A	SYBU	VCAM1	
PGR	ROPN1L	SYCE3	VPREB3	
PHLDA3	RPARP-AS1	SYNM	VWA1	
PHYH	RPE65	SYNPO	WASHC1	
PINK1	RPL22L1	TACSTD2	WASHC5	
PITX1	RPL30	TAF11	WFDC2	
PKDREJ	RSPH9	TAF13	WNT4	
PKIA	RSPO2	TAF2	XCL2	
PLAAT4	RSPO4	TAFA1	YIF1A	
PLAGL2	RTN4R	TATDN1	ZBED4	
PLCL1	RTN4RL2	TBX15	ZBTB21	
PNMT	RTP1	TCF24	ZBTB5	
PNOC	RWDD2B	TCFL5	ZDBF2	
POLR2K	S100B	TIGD6	ZDHHC2	
POMGNT2	S100Z	TIMM10	ZDHHC24	
POP1	SALL4	TKTL2	ZHX1-C8orf76	

**Anexo 5.** Lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con cisplatino.

AARD	COX7B2	HIPK4	MCCC1	RANBP6	TIGIT
AC008691.1	CRYGS	HIST1H2BL	MFS6L	RAP2B	TKTL2
AC011525.1	CSGALNACT1	HIST1H3G	MKKS	RBP7	TLR5
AC025171.1	CSMD3	HIST1H4I	MPLKIP	RCC1L	TMEM270
ADA	CSNK1G3	HOXA13	MRPL13	RDH10	TMEM61
ADAM30	CSRNP1	HOXC13	MSL2	REM1	TMEM64
AGL	CYP7B1	HSPB3	MTERF3	RFLNB	TMEM70
AL033529.1	DDX53	IFNA14	NCALD	RIMS3	TRIM55
AMIGO1	DHDDS	IFNA8	NDUFAF6	RMDN1	TSHZ3
ANGPTL4	DNASE2	IGIP	NEFM	RNF170	TTC9B
ANKRD33B	DNTTIP2	IL23R	NR3C1	ROMO1	TYMP
ANKRD46	DPH3	IMPA1	NUDT18	ROPN1L	UBE2D2
AP4B1	DRD1	IMPG2	NUDT8	RPARP-AS1	UMPS
APOC3	EPM2AIP1	INHA	OSGEPL1	RPE65	VANGL1
APOD	ERICH5	ITGA9	OSGIN2	RPL39L	VCPIP1
ARL14	FAM182B	ITPRIP	OTUD6B	RSPO2	WASHC5
ARL6	FAM200A	JPH1	OTULIN	RSPO4	WNT10A
ATP13A4	FAM83A	JRKL	OXCT1	RTN4R	WNT2
ATP6V1C1	FASTKD2	KBTD3	OXSM	RTN4RL2	WNT4
ATXN7L3B	FBN2	KCNA10	PARD6B	S100B	ZBED4
BARD1	FBXO43	KCNA3	PARD6G	SEC22A	ZBED5
BBS12	FEM1A	KCNA5	PARS2	SEMA3E	ZBTB21
BLID	FEM1C	KCNK6	PATE3	SHLD1	ZC3HAV1L
BMP7	FN3K	KIF4B	PECAM1	SIAH2	ZFP3
BMPR2	FOXRED1	KLF15	PECR	SIL1	ZHX1-C8orf76
BPGM	FZD1	KLHL9	PEX1	SLC17A3	ZHX2
C1orf210	FZD2	KRTAP11-1	PEX2	SLC45A2	ZNF132
C2orf88	GDF9	KRTAP13-4	PGBD2	SLCO5A1	ZNF345
C5orf30	GGN	KRTAP19-2	PIGZ	SMIM12	ZNF354C
C5orf47	GJA5	KRTAP19-3	PITX1	SNX16	ZNF420
C7orf33	GK2	KRTAP19-4	PKDREJ	SPATA45	ZNF471
CALB1	GLYAT	KRTAP19-6	PLAAT2	SPTSSB	ZNF502
CARD6	GNG7	KRTAP21-3	PLAC8L1	STX11	ZNF527
CASTOR2	GNRH1	KRTAP6-2	POLR2K	SUOX	ZNF572
CATSPER3	GOLPH3	KRTAP7-1	POLR3D	SUSD5	ZNF574
CCDC126	GPIHBP1	L1TD1	PON2	SYCE2	ZNF575
CCDC8	GPR157	LCE3A	POP1	SYCE3	ZNF616

CCDC87	GRHL2	LIPT2	PPIAL4A	SYNPO	ZNF621
CCIN	GSS	LNP1	PPP1R42	TACSTD2	ZNF644
CDA	GTF2E1	LRRC25	PROCR	TAF11	ZNF706
CDK4	H3F3C	LSM10	PRR9	TCF24	ZNF729
CHST6	HBD	LUZP1	PYDC2	TG	ZNF736
CLDN19	HESX1	MAP3K1	QTRT2	THAP8	ZNF77
COL8A1	HGD	MAST1	RAB38	TIGD6	

**Anexo 6.** Lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducido por el tratamiento con etopósido.

AARD	CHAMP1	GYPC	MRFAP1L1	SALL4	ZNF527
AC008691.1	CHST6	HACD2	MRPS25	SAMD9L	ZNF556
AC025171.1	CLDN19	HELLPAR	MTERF3	SBSPON	ZNF574
AC104532.1	COA4	HGF	NBPF20	SCG2	ZNF594
ACVR2B	COX7B2	HGH1	NEFM	SCRG1	ZNF596
ADA	CPA6	HIST1H2BL	NEIL2	SEC22A	ZNF644
ADAM30	CRISPLD1	HIST1H3G	OTUD6B	SLC17A3	ZNF706
ADM5	CRYGS	HOXA13	OXSM	SLC26A4-AS1	ZNF729
AGL	CSGALNACT1	HOXC13	PARD6G	SLC2A10	ZNF736
AHCY	CTHRC1	HSPB3	PARS2	SLC35B2	
AIPL1	CTNNBIP1	IFNA14	PERM1	SLC45A2	
ALG14	CYBRD1	IFNA8	PEX1	SNX16	
ALG6	CYP7A1	IL7	PEX2	SPATA45	
AMH	CYP7B1	INHA	PGBD2	SPR	
AMIGO1	DHDDS	IQCX	PINK1	STAR	
ANKRD33B	DHRS13	ITPRIP	PITX1	SYNPO	
ANKRD46	DNAJC5	JRKL	PKDREJ	TACSTD2	
ANKRD50	DNASE2	KBTD3	PKIA	TAF11	
AP4B1	DRD1	KCNA10	PLAGL2	TAF13	
APOC3	EID2B	KCNA3	PNMT	TCF24	
AQP12B	EIF2B3	KCNA5	POLR2K	TIGD6	
AREG	EPM2AIP1	KIF4B	POP1	TKTL2	
ARHGEF5	ESM1	KLF15	PPARA	TLCD3A	
ARL14EP	EXTL3	KLHL36	PPIAL4A	TLR5	
ATXN7L3B	FAM200A	KLHL9	PPP1R32	TMEM126A	
BBS10	FAM241A	KRTAP11-1	PRMT2	TMEM61	
BBS12	FBXO40	KRTAP13-4	PRSS23	TMEM64	
BLID	FBXO43	KRTAP19-4	PTGIS	TMEM70	
BMPR2	FBXO46	KRTAP20-4	RAB23	TSHZ3	
BRD3OS	FEM1A	KRTAP21-3	RAB38	TSPAN12	
C17orf100	FITM2	KRTAP22-2	RAD54B	TWIST2	
C1orf210	FIZ1	KRTAP6-2	RANBP6	TXN2	
C2orf88	FTL	KRTAP7-1	RASL10A	UCP3	
C5orf24	FZD1	L1TD1	RDH10	VANGL1	
C5orf30	FZD2	LACTB2	REM1	WASHC5	
CARD6	GAGE2A	LCE3A	RFLNB	WFDC2	
CATSPER3	GAL3ST4	LEAP2	RHOG	WNT4	

CCDC126	GDF9	LRRC25	RIDA	ZBED4
CCDC87	GEMIN4	LSM10	RMDN1	ZBTB21
CCIN	GLMN	LSM11	RPE65	ZBTB5
CCN4	GLYAT	LSM3	RSPO2	ZDHHC24
CCT8L2	GMNC	MAP3K1	RSPO4	ZHX1-C8orf76
CD52	GTF2E1	MAST1	RTN4R	ZNF256
CDA	GTSF1L	MPLKIP	RTN4RL2	ZNF329

**Anexo 7.** Lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino y etopósido.

AARD	CCIN	HOXA13	LCE3A	RDH10	TMEM64
AC008691.1	CDA	HOXC13	LRRC25	REM1	TMEM70
AC025171.1	CHST6	HSPB3	LSM10	RFLNB	TSHZ3
ADA	CLDN19	IFNA14	MAP3K1	RMDN1	VANGL1
ADAM30	COX7B2	IFNA8	MAST1	RPE65	WASHC5
AGL	CRYGS	INHA	MPLKIP	RSPO2	WNT4
AMIGO1	CSGALNACT1	ITPRIP	MTERF3	RSPO4	ZBED4
ANKRD33B	CYP7B1	JRKL	NEFM	RTN4R	ZBTB21
ANKRD46	DHDDS	KBTBD3	OTUD6B	RTN4RL2	ZHX1-C8orf76
AP4B1	DNASE2	KCNA10	OXSM	SEC22A	ZNF527
APOC3	DRD1	KCNA3	PARD6G	SLC17A3	ZNF574
ATXN7L3B	EPM2AIP1	KCNA5	PARS2	SLC45A2	ZNF644
BBS12	FAM200A	KIF4B	PEX1	SNX16	ZNF706
BLID	FBXO43	KLF15	PEX2	SPATA45	ZNF729
BMPR2	FEM1A	KLHL9	PGBD2	SYNPO	ZNF736
C1orf210	FZD1	KRTAP11-1	PITX1	TACSTD2	
C2orf88	FZD2	KRTAP13-4	PKDREJ	TAF11	
C5orf30	GDF9	KRTAP19-4	POLR2K	TCF24	
CARD6	GLYAT	KRTAP21-3	POP1	TIGD6	
CATSPER3	GTF2E1	KRTAP6-2	PPIAL4A	TKTL2	
CCDC126	HIST1H2BL	KRTAP7-1	RAB38	TLR5	
CCDC87	HIST1H3G	L1TD1	RANBP6	TMEM61	

**Anexo 8.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino.

LIST TF		LIST MIR				
AR	PAX8	MIR100	MIR125A	MIR138-1	MIR18B	MIR218-1
ARHGAP35	PDX1	MIR101-1	MIR125B1	MIR138-2	MIR1908	MIR218-2
ATF1	POU2F1	MIR101-2	MIR125B2	MIR139	MIR1909	MIR219A1
ATF2	POU3F1	MIR103A1	MIR126	MIR140	MIR190A	MIR219A2
BACH1	POU3F2	MIR103A2	MIR1262	MIR141	MIR191	MIR22
CDX1	PPARA	MIR105-1	MIR1266	MIR142	MIR1910	MIR221
CEBPA	PPARD	MIR105-2	MIR1267	MIR143	MIR1913	MIR222
CREB1	PPARG	MIR106A	MIR127	MIR144	MIR1914	MIR223
CTCF	PRDM14	MIR106B	MIR1270	MIR145	MIR1915	MIR224
E2F1	RARA	MIR107	MIR1271	MIR146A	MIR192	MIR2276
E2F2	RARB	MIR10A	MIR1273H	MIR146B	MIR193A	MIR2278
E2F4	RARG	MIR10B	MIR1275	MIR148A	MIR193B	MIR2355
EGR1	RELA	MIR1178	MIR1276	MIR148B	MIR194-1	MIR23A
EPAS1	RXRA	MIR1180	MIR1277	MIR149	MIR194-2	MIR23B
ESR1	SP1	MIR1183	MIR1278	MIR150	MIR195	MIR23C
ESR2	SP3	MIR1197	MIR1281	MIR151A	MIR196A1	MIR24-1
ETS1	SPI1	MIR1-2	MIR128-1	MIR152	MIR196A2	MIR24-2
FLI1	STAT5B	MIR1200	MIR1285-1	MIR153-1	MIR196B	MIR2467
FOS	TFAP2A	MIR1203	MIR1286	MIR153-2	MIR1976	MIR25
FOXA1	TFAP2B	MIR1206	MIR1287	MIR1537	MIR199A1	MIR2682
FOXP3	TGIF1	MIR1208	MIR1288	MIR1539	MIR199A2	MIR26A1
GATA2	TP53	MIR122	MIR1289-1	MIR154	MIR199B	MIR26A2
GATA3	TP63	MIR1224	MIR1289-2	MIR155	MIR19A	MIR26B
GATA4	TP73	MIR1226	MIR1290	MIR15A	MIR19B1	MIR27A
GRHL2	USF1	MIR1227	MIR1291	MIR15B	MIR19B2	MIR27B
HIF1A	USF2	MIR1231	MIR129-1	MIR16-1	MIR200A	MIR28
HNF4A	WT1	MIR1233-1	MIR1292	MIR16-2	MIR200B	MIR2909
HOXA13	YY1	MIR1233-2	MIR1294	MIR17	MIR200C	MIR296
HOXA9	ZIC2	MIR1236	MIR1296	MIR181A1	MIR202	MIR298
HOXC13	ZNF263	MIR1237	MIR1301	MIR181A2	MIR203A	MIR299
JUN		MIR1238	MIR1303	MIR181B1	MIR204	MIR29A
KLF15		MIR124-1	MIR1304	MIR181B2	MIR205	MIR29B1
LEF1		MIR124-2	MIR1306	MIR181C	MIR206	MIR29B2
MEIS2		MIR124-3	MIR1307	MIR181D	MIR20A	MIR29C

MITF	MIR1244-1	MIR130A	MIR182	MIR20B	MIR300
MYB	MIR1246	MIR130B	MIR1825	MIR21	MIR301A
MYC	MIR1247	MIR132	MIR183	MIR211	MIR301B
NFIA	MIR1248	MIR1322	MIR184	MIR2110	MIR302A
NFIC	MIR1249	MIR133B	MIR185	MIR2116	MIR302B
NFKB1	MIR1252	MIR134	MIR186	MIR2117	MIR3064
NR1H2	MIR1253	MIR1343	MIR187	MIR214	MIR30A
NR2F1	MIR1255B2	MIR135B	MIR188	MIR215	MIR30B
NR3C1	MIR1258	MIR136	MIR18A	MIR216A	MIR30C1

**Anexo 8.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino (continuación).

MIR30C2	MIR3179-4	MIR3618	MIR382	MIR431	MIR4498
MIR30D	MIR3181	MIR3619	MIR383	MIR4310	MIR4499
MIR30E	MIR3183	MIR362	MIR3909	MIR4317	MIR449A
MIR31	MIR3188	MIR3620	MIR3910-2	MIR432	MIR449B
MIR3116-1	MIR3191	MIR363	MIR3915	MIR4320	MIR449C
MIR3117	MIR3192	MIR3646	MIR3919	MIR4326	MIR4500
MIR3120	MIR3193	MIR3651	MIR3921	MIR433	MIR4503
MIR3121	MIR3194	MIR3652	MIR3922	MIR4420	MIR4504
MIR3122	MIR3196	MIR3654	MIR3926-1	MIR4421	MIR4506
MIR3126	MIR3198-2	MIR3655	MIR3929	MIR4422	MIR450A1
MIR3127	MIR3199-2	MIR3659	MIR3936	MIR4423	MIR450B
MIR3128	MIR32	MIR365A	MIR3938	MIR4424	MIR4511
MIR3130-2	MIR3202-1	MIR365B	MIR3939	MIR4427	MIR4512
MIR3132	MIR320B1	MIR3662	MIR3940	MIR4428	MIR4518
MIR3133	MIR320E	MIR3664	MIR3941	MIR4432	MIR4519
MIR3134	MIR323A	MIR3666	MIR3942	MIR4434	MIR452
MIR3135A	MIR323B	MIR3667	MIR3944	MIR4435-1	MIR4520-1
MIR3136	MIR324	MIR3671	MIR3945	MIR4435-2	MIR4522
MIR3137	MIR326	MIR3675	MIR3960	MIR4436B1	MIR4523
MIR3138	MIR329-1	MIR3677	MIR3973	MIR4436B2	MIR4524A
MIR3139	MIR329-2	MIR3679	MIR409	MIR4438	MIR4525
MIR3140	MIR330	MIR3680-1	MIR410	MIR4439	MIR4526
MIR3144	MIR331	MIR3680-2	MIR411	MIR4441	MIR4528
MIR3150A	MIR335	MIR3682	MIR412	MIR4445	MIR4529
MIR3151	MIR337	MIR369	MIR421	MIR4446	MIR4534
MIR3153	MIR338	MIR3691	MIR423	MIR4447	MIR454
MIR3154	MIR339	MIR3692	MIR424	MIR4450	MIR455
MIR3155A	MIR33A	MIR371A	MIR425	MIR4451	MIR4632
MIR3157	MIR340	MIR371B	MIR4251	MIR4452	MIR4633
MIR3158-1	MIR342	MIR372	MIR4254	MIR4453	MIR4635
MIR3160-1	MIR345	MIR373	MIR4257	MIR4457	MIR4636
MIR3162	MIR346	MIR374A	MIR4258	MIR4458	MIR4639
MIR3163	MIR34A	MIR374B	MIR4263	MIR4467	MIR4640
MIR3164	MIR34B	MIR376A1	MIR4270	MIR4469	MIR4641

MIR3165	MIR34C	MIR376A2	MIR4274	MIR4470	MIR4642
MIR3170	MIR3609	MIR376B	MIR4287	MIR4473	MIR4644
MIR3173	MIR361	MIR376C	MIR429	MIR4474	MIR4646
MIR3174	MIR3611	MIR377	MIR4292	MIR4476	MIR4647
MIR3175	MIR3612	MIR378A	MIR4295	MIR448	MIR4651
MIR3176	MIR3613	MIR378J	MIR4300	MIR4480	MIR4653
MIR3177	MIR3614	MIR379	MIR4306	MIR4482	MIR4657
MIR3178	MIR3615	MIR380	MIR4307	MIR4485	MIR4659A
MIR3179-1	MIR3616	MIR381	MIR4308	MIR4496	MIR4663

**Anexo 8.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino (continuación).

MIR4664	MIR4756	MIR500B	MIR548B	MIR5688	MIR6132
MIR4665	MIR4760	MIR501	MIR548BB	MIR569	MIR6133
MIR4666A	MIR4763	MIR5010	MIR548C	MIR5690	MIR615
MIR4667	MIR4764	MIR503	MIR548D1	MIR5692B	MIR616
MIR4668	MIR4766	MIR504	MIR548E	MIR5695	MIR6165
MIR4671	MIR4768	MIR5047	MIR548F1	MIR5697	MIR619
MIR4672	MIR4771-2	MIR505	MIR548F3	MIR5698	MIR620
MIR4673	MIR4775	MIR506	MIR548F5	MIR5702	MIR623
MIR4676	MIR4777	MIR5088	MIR548H1	MIR5706	MIR625
MIR4680	MIR4779	MIR5089	MIR548H3	MIR571	MIR627
MIR4684	MIR4781	MIR5090	MIR548J	MIR574	MIR629
MIR4685	MIR4782	MIR5091	MIR548K	MIR575	MIR630
MIR4688	MIR4784	MIR5094	MIR548L	MIR576	MIR634
MIR4690	MIR4786	MIR511	MIR548M	MIR578	MIR635
MIR4691	MIR4787	MIR5187	MIR548O2	MIR5787	MIR636
MIR4695	MIR4789	MIR5189	MIR548S	MIR579	MIR637
MIR4698	MIR4793	MIR5190	MIR548T	MIR580	MIR640
MIR4699	MIR4795	MIR5192	MIR548U	MIR581	MIR641
MIR4700	MIR4796	MIR5193	MIR548V	MIR582	MIR642A
MIR4701	MIR4797	MIR5194	MIR548Y	MIR583	MIR643
MIR4707	MIR4799	MIR5196	MIR550A1	MIR584	MIR647
MIR4709	MIR4800	MIR519D	MIR550A2	MIR586	MIR648
MIR4714	MIR4802	MIR539	MIR550A3	MIR587	MIR649
MIR4715	MIR4803	MIR541	MIR551B	MIR588	MIR6500
MIR4720	MIR4804	MIR542	MIR552	MIR589	MIR6501
MIR4721	MIR483	MIR544A	MIR556	MIR590	MIR6502
MIR4722	MIR484	MIR544B	MIR558	MIR591	MIR6504
MIR4723	MIR485	MIR545	MIR5581	MIR593	MIR6506
MIR4724	MIR486-1	MIR548A3	MIR5582	MIR595	MIR6508
MIR4725	MIR491	MIR548AA2	MIR5583-2	MIR596	MIR6509
MIR4726	MIR493	MIR548AC	MIR5584	MIR597	MIR6510
MIR4727	MIR494	MIR548AG2	MIR5585	MIR601	MIR6511A1
MIR4728	MIR495	MIR548AH	MIR5586	MIR602	MIR6511B1
MIR4729	MIR496	MIR548AM	MIR5587	MIR603	MIR6511B2
MIR4731	MIR497	MIR548AN	MIR5588	MIR605	MIR6512

MIR4738	MIR4999	MIR548AO	MIR559	MIR607	MIR6513
MIR4742	MIR5000	MIR548AQ	MIR5590	MIR6073	MIR6514
MIR4743	MIR5001	MIR548AR	MIR5591	MIR6079	MIR6515
MIR4747	MIR5003	MIR548AS	MIR561	MIR608	MIR6516
MIR4749	MIR5006	MIR548AT	MIR562	MIR609	MIR652
MIR4751	MIR5008	MIR548AU	MIR564	MIR612	MIR654
MIR4753	MIR5009	MIR548AW	MIR567	MIR6124	MIR655
MIR4755	MIR500A	MIR548AX	MIR5687	MIR613	MIR656
MIR4664	MIR4756	MIR500B	MIR548B	MIR5688	MIR6132

**Anexo 8.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino (continuación).

MIR657	MIR6759	MIR6808	MIR6856	MIR7113	MIR873
MIR658	MIR676	MIR6809	MIR6857	MIR7150	MIR874
MIR660	MIR6760	MIR6810	MIR6858	MIR7158	MIR876
MIR661	MIR6762	MIR6811	MIR6859-1	MIR7160	MIR877
MIR663A	MIR6766	MIR6812	MIR6859-3	MIR7161	MIR885
MIR664A	MIR6768	MIR6814	MIR6862-1	MIR7162	MIR887
MIR664B	MIR6769A	MIR6816	MIR6862-2	MIR7-2	MIR889
MIR665	MIR6769B	MIR6817	MIR6864	MIR7-3	MIR9-1
MIR671	MIR6770-1	MIR6818	MIR6865	MIR744	MIR9-2
MIR6717	MIR6770-3	MIR6819	MIR6866	MIR758	MIR921
MIR6719	MIR6771	MIR6820	MIR6867	MIR760	MIR922
MIR6721	MIR6772	MIR6821	MIR6868	MIR761	MIR924
MIR6726	MIR6774	MIR6822	MIR6869	MIR762	MIR92A1
MIR6727	MIR6775	MIR6823	MIR6870	MIR765	MIR92A2
MIR6728	MIR6776	MIR6824	MIR6871	MIR766	MIR92B
MIR6729	MIR6778	MIR6825	MIR6872	MIR767	MIR93
MIR6730	MIR6779	MIR6826	MIR6873	MIR769	MIR9-3
MIR6731	MIR6780A	MIR6827	MIR6874	MIR770	MIR933
MIR6732	MIR6780B	MIR6829	MIR6875	MIR7703	MIR934
MIR6733	MIR6781	MIR6830	MIR6876	MIR7704	MIR936
MIR6734	MIR6783	MIR6831	MIR6877	MIR7843	MIR937
MIR6735	MIR6785	MIR6832	MIR6878	MIR7847	MIR939
MIR6736	MIR6786	MIR6833	MIR6879	MIR7848	MIR940
MIR6738	MIR6787	MIR6834	MIR6880	MIR7850	MIR942
MIR6739	MIR6789	MIR6835	MIR6881	MIR7851	MIR943
MIR6740	MIR6790	MIR6836	MIR6883	MIR7853	MIR944
MIR6741	MIR6791	MIR6837	MIR6884	MIR7854	MIR95
MIR6742	MIR6792	MIR6838	MIR6885	MIR7855	MIR96
MIR6743	MIR6793	MIR6839	MIR6887	MIR7856	MIR98
MIR6744	MIR6794	MIR6840	MIR6888	MIR7976	MIR99A
MIR6745	MIR6795	MIR6842	MIR6889	MIR7978	MIR99B
MIR6746	MIR6796	MIR6844	MIR6890	MIR802	MIRLET7A1
MIR6747	MIR6797	MIR6845	MIR6891	MIR8055	MIRLET7A2
MIR6748	MIR6798	MIR6846	MIR6892	MIR8057	MIRLET7A3
MIR6749	MIR6799	MIR6847	MIR6893	MIR8061	MIRLET7B

MIR675	MIR6800	MIR6848	MIR6894	MIR8063	MIRLET7C
MIR6750	MIR6801	MIR6849	MIR6895	MIR8064	MIRLET7D
MIR6751	MIR6802	MIR6850	MIR7-1	MIR8072	MIRLET7E
MIR6752	MIR6803	MIR6851	MIR7106	MIR8073	MIRLET7F1
MIR6754	MIR6804	MIR6852	MIR7109	MIR8077	MIRLET7F2
MIR6755	MIR6805	MIR6853	MIR711	MIR8082	MIRLET7G
MIR6756	MIR6806	MIR6854	MIR7110	MIR8085	MIRLET7I
MIR6758	MIR6807	MIR6855	MIR7111	MIR8485	
MIR657	MIR6759	MIR6808	MIR6856	MIR7113	

**Anexo 8.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con cisplatino (continuación).

**INDIVIDUAL NETWORKS**

<b>NR3C1</b>				
<b>LIST TF</b>				
AR	MIR192	MIR369	MIR5088	MIR769
ARHGAP35	MIR193B	MIR374A	MIR5089	MIR8072
CREB1	MIR196A2	MIR377	MIR5091	MIR8085
FOXP3	MIR199A2	MIR382	MIR5094	MIR8485
HIF1A	MIR199B	MIR3909	MIR511	MIR93
MYB	MIR19B1	MIR3941	MIR5193	MIR939
NFIA	MIR19B2	MIR423	MIR544A	MIRLET7A2
NFIC	MIR203A	MIR4263	MIR548AH	MIRLET7A3
NFKB1	MIR204	MIR4292	MIR548AQ	MIRLET7B
NR3C1	MIR20A	MIR4307	MIR548D1	MIRLET7C
SP1	MIR20B	MIR4422	MIR558	GRHL2
SPI1	MIR21	MIR4423	MIR5582	LIST TF
TFAP2A	MIR214	MIR4434	MIR5586	AR
TP63	MIR215	MIR4438	MIR5590	EPAS1
<b>LIST MIR</b>				
MIR100	MIR22	MIR4446	MIR5692B	ESR1
MIR103A2	MIR223	MIR4470	MIR583	FOXA1
MIR106A	MIR26B	MIR4498	MIR590	GRHL2
MIR106B	MIR28	MIR4524A	MIR593	LIST MIR
MIR1237	MIR301A	MIR4528	MIR597	MIR26B
MIR124-3	MIR30B	MIR454	MIR603	MIR4709
MIR1248	MIR30C1	MIR4646	MIR623	MIR4779
MIR1255B2	MIR30D	MIR4672	MIR625	MIR6870
MIR125B1	MIR30E	MIR4688	MIR6512	MIR6894
MIR125B2	MIR31	MIR4699	MIR660	MIR765
MIR126	MIR3121	MIR4709	MIR6768	MIR766
MIR127	MIR3128	MIR4714	MIR6798	
MIR1277	MIR3130-2	MIR4727	MIR6800	
MIR1296	MIR3150A	MIR4738	MIR6806	
MIR130B	MIR3154	MIR4749	MIR6849	
MIR1322	MIR3162	MIR4755	MIR6852	
MIR138-2	MIR3177	MIR4763	MIR6859-1	
	MIR3181	MIR4764	MIR6859-3	

MIR155	MIR32	MIR4779	MIR6868
MIR17	MIR324	MIR4786	MIR6870
MIR182	MIR326	MIR4793	MIR6877
MIR183	MIR329-1	MIR4795	MIR6878
MIR186	MIR329-2	MIR4796	MIR6894
MIR18A	MIR33A	MIR496	MIR7-1
MIR1909	MIR3609	MIR5000	MIR762
MIR190A	MIR362	MIR5001	MIR765

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido.

LIST TF		LIST MIR				
AR	PPARA	MIR100	MIR1258	MIR139	MIR1910	MIR219A2
ATF2	PPARD	MIR101-1	MIR125A	MIR140	MIR1913	MIR22
BACH1	PRDM14	MIR101-2	MIR125B1	MIR141	MIR1914	MIR221
CDX1	RARA	MIR103A1	MIR125B2	MIR142	MIR1915	MIR222
CEBPA	RARB	MIR103A2	MIR126	MIR143	MIR192	MIR223
CEBPB	RARG	MIR105-1	MIR1262	MIR144	MIR193A	MIR224
CREB1	RELA	MIR105-2	MIR1266	MIR145	MIR193B	MIR2276
CTCF	RUNX1	MIR106A	MIR1267	MIR146A	MIR194-1	MIR2278
E2F1	RXRA	MIR106B	MIR1270	MIR146B	MIR194-2	MIR23A
E2F2	SALL4	MIR107	MIR1271	MIR148B	MIR195	MIR23B
E2F4	SMAD3	MIR10A	MIR1273H	MIR149	MIR196A1	MIR23C
EGR1	SMAD4	MIR10B	MIR1275	MIR150	MIR196A2	MIR24-1
EPAS1	SP1	MIR1178	MIR1276	MIR151A	MIR196B	MIR24-2
ESR1	SP3	MIR1184-1	MIR1277	MIR153-1	MIR1976	MIR2467
ESR2	TAL1	MIR1185-1	MIR1281	MIR153-2	MIR199A1	MIR25
ETS1	TFAP2A	MIR1185-2	MIR128-1	MIR1537	MIR199A2	MIR2682
FOS	TFAP2B	MIR1-2	MIR1285-1	MIR1539	MIR199B	MIR26A1
FOXA1	TGIF1	MIR1200	MIR1287	MIR155	MIR19A	MIR26A2
FOXM1	TP53	MIR1203	MIR1288	MIR15A	MIR19B1	MIR26B
FOXP3	TP63	MIR1206	MIR1289-1	MIR15B	MIR19B2	MIR27A
GATA3	TP73	MIR1208	MIR1289-2	MIR16-1	MIR200A	MIR27B
GATA4	USF1	MIR122	MIR1290	MIR16-2	MIR200B	MIR28
HIF1A	USF2	MIR1224	MIR129-1	MIR17	MIR200C	MIR2909
HNF1A	VDR	MIR1226	MIR1292	MIR181A1	MIR202	MIR296
HNF4A	WT1	MIR1227	MIR1293	MIR181A2	MIR203A	MIR298
HOXA13	YY1	MIR1231	MIR1294	MIR181B1	MIR204	MIR299
HOXA9	ZIC2	MIR1233-1	MIR1296	MIR181B2	MIR205	MIR29A
HOXB13		MIR1233-2	MIR1301	MIR181C	MIR206	MIR29B1
HOXC13		MIR1236	MIR1303	MIR181D	MIR20A	MIR29B2
JUN		MIR1237	MIR1304	MIR182	MIR20B	MIR29C
KLF15		MIR1238	MIR1306	MIR1825	MIR21	MIR300
LEF1		MIR124-1	MIR1307	MIR183	MIR210	MIR301A
MEIS2		MIR124-2	MIR130A	MIR184	MIR211	MIR301B
MITF		MIR124-3	MIR130B	MIR185	MIR2110	MIR302A

MYB	MIR1244-1	MIR132	MIR186	MIR2116	MIR302B
MYC	MIR1246	MIR1323	MIR187	MIR2117	MIR302C
NFIA	MIR1247	MIR133B	MIR188	MIR212	MIR302D
NFIC	MIR1249	MIR134	MIR18A	MIR214	MIR3064
NFKB1	MIR1252	MIR1343	MIR18B	MIR215	MIR3074
NR1I2	MIR1253	MIR135B	MIR1908	MIR216A	MIR30A
NR2F1	MIR1255A	MIR136	MIR1909	MIR218-1	MIR30B
NR2F2	MIR1255B2	MIR138-1	MIR190A	MIR218-2	MIR30C1
PDX1	MIR1256	MIR138-2	MIR191	MIR219A1	MIR30C2

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR30D	MIR3193	MIR3652	MIR3922	MIR4423	MIR4525	MIR4720
MIR30E	MIR3194	MIR3654	MIR3926-1	MIR4424	MIR4526	MIR4721
MIR31	MIR3196	MIR3655	MIR3929	MIR4427	MIR4528	MIR4722
MIR3115	MIR3198-2	MIR365A	MIR3936	MIR4432	MIR4529	MIR4723
MIR3116-1	MIR3199-2	MIR365B	MIR3938	MIR4435-1	MIR4534	MIR4724
MIR3117	MIR32	MIR3662	MIR3940	MIR4435-2	MIR454	MIR4725
MIR3120	MIR3202-1	MIR3664	MIR3941	MIR4436B1	MIR455	MIR4726
MIR3121	MIR320B1	MIR3666	MIR3942	MIR4436B2	MIR4632	MIR4727
MIR3122	MIR320B2	MIR3667	MIR3944	MIR4438	MIR4633	MIR4728
MIR3125	MIR323A	MIR367	MIR3960	MIR4441	MIR4635	MIR4729
MIR3126	MIR323B	MIR3671	MIR3973	MIR4445	MIR4639	MIR4731
MIR3127	MIR324	MIR3675	MIR3978	MIR4446	MIR4640	MIR4738
MIR3128	MIR326	MIR3677	MIR409	MIR4447	MIR4641	MIR4742
MIR3129	MIR329-1	MIR3679	MIR410	MIR4451	MIR4642	MIR4743
MIR3130-2	MIR329-2	MIR3680-1	MIR411	MIR4452	MIR4644	MIR4747
MIR3133	MIR330	MIR3680-2	MIR412	MIR4453	MIR4646	MIR4748
MIR3134	MIR331	MIR3682	MIR422A	MIR4457	MIR4647	MIR4753
MIR3135A	MIR335	MIR3688-2	MIR423	MIR4458	MIR4651	MIR4755
MIR3136	MIR337	MIR369	MIR424	MIR4467	MIR4653	MIR4756
MIR3144	MIR339	MIR3692	MIR425	MIR4469	MIR4657	MIR4760
MIR3150A	MIR33A	MIR371A	MIR4251	MIR4470	MIR4659A	MIR4761
MIR3151	MIR340	MIR371B	MIR4254	MIR4474	MIR4663	MIR4763
MIR3152	MIR342	MIR372	MIR4257	MIR4476	MIR4664	MIR4764
MIR3153	MIR345	MIR373	MIR4263	MIR448	MIR4665	MIR4765
MIR3154	MIR346	MIR374A	MIR4270	MIR4485	MIR4666A	MIR4766
MIR3155A	MIR34A	MIR374B	MIR4287	MIR4496	MIR4667	MIR4768
MIR3157	MIR34B	MIR376A1	MIR429	MIR4499	MIR4668	MIR4771-2
MIR3158-1	MIR34C	MIR376A2	MIR4292	MIR449A	MIR4672	MIR4777
MIR3160-1	MIR3605	MIR376B	MIR4295	MIR449B	MIR4673	MIR4779
MIR3163	MIR3609	MIR376C	MIR4300	MIR449C	MIR4676	MIR4781
MIR3164	MIR361	MIR377	MIR4306	MIR4500	MIR4680	MIR4782
MIR3165	MIR3611	MIR378A	MIR4308	MIR4503	MIR4684	MIR4784
MIR3170	MIR3612	MIR378J	MIR431	MIR4504	MIR4685	MIR4785
MIR3173	MIR3613	MIR379	MIR4310	MIR450A1	MIR4691	MIR4786

MIR3175	MIR3614	MIR380	MIR4315-1	MIR450A2	MIR4695	MIR4789
MIR3176	MIR3615	MIR381	MIR4315-2	MIR450B	MIR4698	MIR4793
MIR3178	MIR3616	MIR382	MIR4317	MIR4512	MIR4699	MIR4795
MIR3179-1	MIR3618	MIR383	MIR4324	MIR4517	MIR4700	MIR4796
MIR3179-4	MIR3619	MIR3910-2	MIR4326	MIR4518	MIR4701	MIR4797
MIR3183	MIR362	MIR3914-2	MIR433	MIR4519	MIR4707	MIR4803
MIR3188	MIR3620	MIR3916	MIR4420	MIR452	MIR4709	MIR4804
MIR3191	MIR363	MIR3919	MIR4421	MIR4522	MIR4714	MIR483
MIR3192	MIR3646	MIR3921	MIR4422	MIR4523	MIR4715	MIR484

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR485	MIR544B	MIR552	MIR604	MIR6514	MIR6748	MIR6799
MIR486-1	MIR545	MIR553	MIR605	MIR6515	MIR6749	MIR6800
MIR487A	MIR548A3	MIR556	MIR607	MIR6516	MIR675	MIR6801
MIR487B	MIR548AA2	MIR558	MIR6073	MIR652	MIR6750	MIR6802
MIR489	MIR548AC	MIR5581	MIR6079	MIR653	MIR6751	MIR6803
MIR491	MIR548AG2	MIR5582	MIR608	MIR654	MIR6752	MIR6804
MIR493	MIR548AH	MIR5583-2	MIR612	MIR655	MIR6753	MIR6806
MIR494	MIR548AM	MIR5585	MIR6124	MIR656	MIR6754	MIR6807
MIR495	MIR548AN	MIR5586	MIR613	MIR657	MIR6755	MIR6808
MIR496	MIR548AO	MIR5587	MIR6132	MIR658	MIR6756	MIR6809
MIR497	MIR548AQ	MIR559	MIR6133	MIR660	MIR6758	MIR6810
MIR4999	MIR548AR	MIR5590	MIR615	MIR661	MIR6759	MIR6811
MIR5000	MIR548AS	MIR5591	MIR616	MIR663A	MIR6762	MIR6812
MIR5001	MIR548AT	MIR561	MIR6165	MIR664A	MIR6763	MIR6813
MIR5003	MIR548AU	MIR562	MIR619	MIR664B	MIR6766	MIR6814
MIR5006	MIR548AW	MIR567	MIR620	MIR665	MIR6768	MIR6816
MIR5008	MIR548AX	MIR5687	MIR623	MIR671	MIR6769A	MIR6817
MIR5009	MIR548B	MIR5688	MIR625	MIR6717	MIR6769B	MIR6818
MIR500A	MIR548BB	MIR569	MIR627	MIR6718	MIR6770-1	MIR6819
MIR500B	MIR548C	MIR5690	MIR628	MIR6719	MIR6770-3	MIR6820
MIR501	MIR548D1	MIR5692B	MIR629	MIR6721	MIR6771	MIR6821
MIR5010	MIR548E	MIR5697	MIR630	MIR6726	MIR6773	MIR6823
MIR502	MIR548F1	MIR5698	MIR634	MIR6727	MIR6775	MIR6824
MIR504	MIR548F3	MIR5702	MIR637	MIR6728	MIR6776	MIR6825
MIR5047	MIR548F5	MIR5706	MIR640	MIR6729	MIR6778	MIR6826
MIR505	MIR548H1	MIR574	MIR641	MIR6730	MIR6779	MIR6827
MIR506	MIR548H3	MIR575	MIR642A	MIR6731	MIR6780A	MIR6829
MIR5088	MIR548J	MIR576	MIR643	MIR6732	MIR6780B	MIR6830
MIR5089	MIR548K	MIR578	MIR644A	MIR6733	MIR6781	MIR6831
MIR5090	MIR548L	MIR579	MIR647	MIR6734	MIR6783	MIR6832
MIR5091	MIR548M	MIR581	MIR649	MIR6735	MIR6785	MIR6833
MIR5187	MIR548N	MIR582	MIR6500	MIR6736	MIR6786	MIR6834
MIR5189	MIR548O2	MIR583	MIR6501	MIR6737	MIR6787	MIR6835
MIR5190	MIR548P	MIR587	MIR6502	MIR6738	MIR6789	MIR6836

MIR5192	MIR548S	MIR588	MIR6504	MIR6739	MIR6790	MIR6837
MIR5193	MIR548T	MIR589	MIR6505	MIR6740	MIR6791	MIR6838
MIR5194	MIR548V	MIR590	MIR6506	MIR6741	MIR6792	MIR6839
MIR519D	MIR548Y	MIR593	MIR6508	MIR6742	MIR6793	MIR6840
MIR532	MIR550A1	MIR595	MIR6509	MIR6743	MIR6794	MIR6842
MIR539	MIR550A2	MIR596	MIR6510	MIR6744	MIR6795	MIR6843
MIR541	MIR550A3	MIR597	MIR6511A1	MIR6745	MIR6796	MIR6844
MIR542	MIR550B2	MIR599	MIR6512	MIR6746	MIR6797	MIR6845
MIR544A	MIR551B	MIR603	MIR6513	MIR6747	MIR6798	MIR6846

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

			<b>INDIVIDUAL NETWORKS</b>			
MIR6847	MIR7106	MIR8077	MIRLET7F2	<b>GATA3</b>		
MIR6848	MIR7107	MIR8082	MIRLET7G	<b>LIST TF</b>	MIR138-2	MIR301A
MIR6849	MIR7108	MIR8085	MIRLET7I	AR	MIR148B	MIR30B
MIR6850	MIR7109	MIR8086		E2F2	MIR155	MIR30C1
MIR6851	MIR7110	MIR8485		FOXP3	MIR15B	MIR30D
MIR6852	MIR7111	MIR873		GATA3	MIR16-2	MIR30E
MIR6853	MIR7113	MIR874		GRHL3	MIR17	MIR31
MIR6854	MIR7114	MIR875		HES4	MIR182	MIR3121
MIR6855	MIR7157	MIR876		PPARA	MIR183	MIR3122
MIR6856	MIR7158	MIR877		PPARG	MIR186	MIR3128
MIR6857	MIR7160	MIR887		STAT1	MIR18A	MIR3130-2
MIR6858	MIR7161	MIR889		TAL1	MIR1909	MIR3133
MIR6859-1	MIR7162	MIR9-1		TET2	MIR190A	MIR3144
MIR6859-3	MIR7-2	MIR9-2		TP73	MIR1914	MIR3150A
MIR6862-1	MIR7-3	MIR921		ZXDC	MIR1915	MIR3153
MIR6862-2	MIR744	MIR922		<b>LIST MIR</b>	MIR192	MIR3154
MIR6864	MIR758	MIR924		MIR100	MIR193B	MIR3162
MIR6865	MIR760	MIR92A1		MIR103A2	MIR196A2	MIR3173
MIR6867	MIR761	MIR92A2		MIR106A	MIR199A2	MIR3177
MIR6868	MIR765	MIR92B		MIR106B	MIR199B	MIR3181
MIR6869	MIR766	MIR93		MIR10B	MIR19B1	MIR32
MIR6870	MIR767	MIR9-3		MIR1-2	MIR19B2	MIR324
MIR6871	MIR769	MIR933		MIR1237	MIR200A	MIR326
MIR6872	MIR770	MIR934		MIR1238	MIR200B	MIR329-1
MIR6873	MIR7703	MIR935		MIR124-3	MIR200C	MIR329-2
MIR6875	MIR7704	MIR936		MIR1248	MIR203A	MIR33A
MIR6876	MIR7705	MIR937		MIR1255B2	MIR204	MIR3605
MIR6878	MIR7843	MIR939		MIR125A	MIR20A	MIR3609
MIR6879	MIR7844	MIR940		MIR125B1	MIR20B	MIR362
MIR6880	MIR7847	MIR942		MIR125B2	MIR21	MIR3651
MIR6881	MIR7850	MIR943		MIR126	MIR214	MIR3655
MIR6883	MIR7851	MIR944		MIR127	MIR215	MIR3662
MIR6884	MIR7854	MIR96		MIR1277	MIR22	MIR3667
MIR6885	MIR7855	MIR98				

MIR6887	MIR7856	MIR99A	MIR1290	MIR223	MIR369
MIR6888	MIR7974	MIRLET7A1	MIR1292	MIR2278	MIR374A
MIR6890	MIR7976	MIRLET7A2	MIR1296	MIR24-1	MIR377
MIR6891	MIR8055	MIRLET7A3	MIR1302-5	MIR24-2	MIR382
MIR6892	MIR8057	MIRLET7B	MIR1307	MIR26A2	MIR3909
MIR6893	MIR8063	MIRLET7C	MIR130B	MIR26B	MIR3912
MIR6894	MIR8064	MIRLET7D	MIR132	MIR27A	MIR3941
MIR6895	MIR8072	MIRLET7E	MIR1322	MIR28	MIR423
MIR7-1	MIR8073	MIRLET7F1	MIR1343	MIR29B1	MIR4263
			MIR138-1	MIR29B2	MIR4270

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR4292	MIR4763	MIR586	MIR6868	MIR6868	FOXP3	MIR125B1	MIR192
MIR4307	MIR4764	MIR590	MIR6870	MIR6870	GATA1	MIR125B2	MIR193B
MIR4422	MIR4769	MIR593	MIR6872	MIR6872	GATA2	MIR126	MIR195
MIR4423	MIR4779	MIR597	MIR6873	MIR6873	JUN	MIR127	MIR196A2
MIR4434	MIR4781	MIR603	MIR6877	MIR6877	KLF1	MIR1276	MIR1976
MIR4435-1	MIR4786	MIR6125	MIR6878	MIR6878	MYB	MIR1277	MIR199A2
MIR4435-2	MIR4789	MIR616	MIR6894	MIR6894	MYBL2	MIR1290	MIR199B
MIR4436B1	MIR4793	MIR623	MIR7-1	MIR7-1	MYC	MIR1292	MIR19B1
MIR4438	MIR4795	MIR625	MIR7106	MIR7106	NFKB1	MIR1293	MIR19B2
MIR4446	MIR4796	MIR647	MIR7111	MIR7111	NFYC	MIR1296	MIR200A
MIR4457	MIR486-1	MIR648	MIR762	MIR762	NME2	MIR1304	MIR200B
MIR4470	MIR491	MIR6506	MIR765	MIR765	NR3C1	MIR130B	MIR200C
MIR4485	MIR496	MIR6512	MIR766	MIR766	PGR	MIR132	MIR203A
MIR4496	MIR5000	MIR660	MIR769	MIR769	PPARA	MIR1322	MIR204
MIR4498	MIR5001	MIR6721	MIR7847	MIR7847	PPARD	MIR1343	MIR20A
MIR4506	MIR5006	MIR6730	MIR7855	MIR7855	PPARG	MIR138-1	MIR20B
MIR4518	MIR5009	MIR6736	MIR8072	MIR8072	RUNX1	MIR138-2	MIR21
MIR4524A	MIR5088	MIR6741	MIR8085	MIR8085	SP1	MIR140	MIR214
MIR4528	MIR5089	MIR6749	MIR8485	MIR8485	SPI1	MIR141	MIR215
MIR4534	MIR5091	MIR6750	MIR922	MIR922	TAL1	MIR142	MIR22
MIR454	MIR5094	MIR6751	MIR92A1	MIR92A1	TFAP2A	MIR143	MIR223
MIR455	MIR511	MIR6755	MIR92A2	MIR92A2	WT1	MIR148A	MIR24-1
MIR4639	MIR5187	MIR6763	MIR93	MIR93	LIST MIR	MIR148B	MIR24-2
MIR4646	MIR5193	MIR6766	MIR933	MIR933	MIR100	MIR150	MIR25
MIR4651	MIR544A	MIR6768	MIR937	MIR937	MIR103A1	MIR155	MIR26A2
MIR4663	MIR548AH	MIR6769A	MIR939	MIR939	MIR103A2	MIR15A	MIR26B
MIR4672	MIR548AQ	MIR6797	MIRLET7A2	MIRLET7A2	MIR105-1	MIR15B	MIR27A
MIR4688	MIR548D1	MIR6798	MIRLET7A3	MIRLET7A3	MIR105-2	MIR16-1	MIR28
MIR4695	MIR548L	MIR6800	MIRLET7B	MIRLET7B	MIR106A	MIR16-2	MIR29B1
MIR4699	MIR548P	MIR6806	MIRLET7C	MIRLET7C	MIR106B	MIR17	MIR29B2
MIR4706	MIR558	MIR6820		MYB	MIR107	MIR181A2	MIR301A
MIR4709	MIR5582	MIR6825		LIST TF	MIR10B	MIR181B2	MIR3064
MIR4714	MIR5584	MIR6827		AR	MIR1178	MIR182	MIR30B

MIR4720	MIR5585	MIR6844	BCL6	MIR1180	MIR1825	MIR30C1
MIR4721	MIR5586	MIR6847	CEBPA	MIR1-2	MIR183	MIR30D
MIR4723	MIR5590	MIR6848	E2F1	MIR1233-1	MIR185	MIR30E
MIR4727	MIR5692B	MIR6849	EGR1	MIR1233-2	MIR186	MIR31
MIR4738	MIR5697	MIR6852	ELK1	MIR1236	MIR18A	MIR3121
MIR4749	MIR5702	MIR6857	ESR1	MIR1237	MIR1909	MIR3125
MIR4750	MIR580	MIR6859-1	ETS1	MIR124-3	MIR190A	MIR3128
MIR4755	MIR582	MIR6859-3	ETS2	MIR1248	MIR191	MIR3130-2
MIR4760	MIR583	MIR6866	ETV4	MIR125A	MIR1914	MIR3133

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR3140	MIR4432	MIR4760	MIR582	MIR6806	MIR8072	GFI1B	TCF7L2
MIR3144	MIR4434	MIR4763	MIR583	MIR6814	MIR8075	HES1	TFAP2A
MIR3150A	MIR4435-1	MIR4764	MIR586	MIR6817	MIR8085	HIF1A	TP53
MIR3153	MIR4435-2	MIR4769	MIR589	MIR6818	MIR8485	HOXB4	WT1
MIR3154	MIR4436B1	MIR4779	MIR590	MIR6820	MIR922	HOXD3	YBX1
MIR3157	MIR4438	MIR4786	MIR593	MIR6825	MIR92A1	INSM1	YY1
MIR3160-1	MIR4445	MIR4789	MIR597	MIR6827	MIR92A2	IRF2	ZNF274
MIR3162	MIR4446	MIR4793	MIR603	MIR6833	MIR92B	IRF3	ZNF750
MIR3173	MIR4453	MIR4795	MIR611	MIR6834	MIR93	JUN	LIST MIR
MIR3177	MIR4467	MIR4796	MIR616	MIR6835	MIR939	JUNB	MIR100
MIR3181	MIR4470	MIR484	MIR623	MIR6837	MIR98	KLF1	MIR101-1
MIR32	MIR4496	MIR486-1	MIR624	MIR6842	MIRLET7A2	LEF1	MIR101-2
MIR324	MIR4498	MIR491	MIR625	MIR6847	MIRLET7A3	MAFF	MIR103A1
MIR326	MIR4524A	MIR496	MIR637	MIR6848	MIRLET7B	MAZ	MIR103A2
MIR329-1	MIR4525	MIR499A	MIR646	MIR6849	MIRLET7C	MEIS1	MIR105-1
MIR329-2	MIR4528	MIR5001	MIR6501	MIR6852	MIRLET7F2	MYB	MIR105-2
MIR33A	MIR4533	MIR5003	MIR6506	MIR6857	MIRLET7G	MYBL2	MIR106A
MIR342	MIR4534	MIR5006	MIR6512	MIR6859-1	MYC	MYC	MIR106B
MIR34A	MIR454	MIR5009	MIR660	MIR6859-3	LIST TF	NFAT5	MIR107
MIR34C	MIR455	MIR503	MIR671	MIR6868	AR	NFATC1	MIR10B
MIR3609	MIR4639	MIR505	MIR6721	MIR6870	ASCL2	NFIC	MIR1178
MIR3613	MIR4644	MIR5088	MIR6727	MIR6877	ATF4	NFKB1	MIR1180
MIR362	MIR4646	MIR5089	MIR6729	MIR6878	ATF7	NME2	MIR1181
MIR3651	MIR4651	MIR5091	MIR6735	MIR6879	CEBPA	PAX8	MIR1182
MIR3662	MIR4653	MIR5094	MIR6739	MIR6882	CEBPZ	PGR	MIR1-2
MIR369	MIR4672	MIR511	MIR6743	MIR6884	CREB1	POU2F1	MIR1200
MIR374A	MIR4677	MIR5193	MIR6747	MIR6893	CXXC1	POU2F2	MIR1203
MIR377	MIR4688	MIR544A	MIR6749	MIR6894	E2F1	PPARA	MIR122
MIR382	MIR4690	MIR548AH	MIR6755	MIR7-1	E2F2	PPARD	MIR1226
MIR3909	MIR4695	MIR548AQ	MIR6763	MIR7106	E2F4	PPARG	MIR1227
MIR3922	MIR4699	MIR548B	MIR6766	MIR7108	EGR3	RARA	MIR1233-1
MIR3941	MIR4707	MIR548C	MIR6768	MIR7110	ELK1	RARB	MIR1233-2
MIR3960	MIR4709	MIR548D1	MIR6771	MIR7111	ESR1	RELA	MIR1236
MIR423	MIR4714	MIR548E	MIR6778	MIR761	ESR2	RFX5	MIR1237
MIR424	MIR4720	MIR548V	MIR6781	MIR762	ETS1	SMAD3	MIR1243

MIR4263	MIR4721	MIR558	MIR6783	MIR765	ETS2	SP1	MIR124-3
MIR4270	MIR4723	MIR5582	MIR6785	MIR766	FOSL1	SP3	MIR1244-1
MIR429	MIR4727	MIR5586	MIR6786	MIR769	FOXM1	STAT1	MIR1248
MIR4292	MIR4747	MIR5590	MIR6792	MIR7847	FOXP3	STAT3	MIR1255B2
MIR4307	MIR4749	MIR5692B	MIR6797	MIR7851	GATA1	STAT4	MIR125A

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR126	MIR148A	MIR19B1	MIR302A	MIR3191	MIR3666	MIR4326	MIR4535
MIR1266	MIR148B	MIR19B2	MIR3064	MIR3192	MIR3671	MIR4422	MIR454
MIR1268B	MIR150	MIR200A	MIR30A	MIR3193	MIR3680-1	MIR4423	MIR455
MIR127	MIR151A	MIR200B	MIR30B	MIR3194	MIR3680-2	MIR4424	MIR4633
MIR1273C	MIR1537	MIR200C	MIR30C1	MIR3198-2	MIR369	MIR4427	MIR4635
MIR1276	MIR1539	MIR203A	MIR30C2	MIR3199-2	MIR3691	MIR4432	MIR4639
MIR1277	MIR155	MIR204	MIR30D	MIR32	MIR3692	MIR4434	MIR4640
MIR1278	MIR15A	MIR20A	MIR30E	MIR3200	MIR371A	MIR4435-1	MIR4641
MIR1281	MIR15B	MIR20B	MIR31	MIR320B1	MIR371B	MIR4435-2	MIR4642
MIR1282	MIR16-1	MIR21	MIR3115	MIR320B2	MIR372	MIR4436B1	MIR4644
MIR1284	MIR16-2	MIR210	MIR3116-1	MIR323A	MIR373	MIR4438	MIR4646
MIR1285-1	MIR17	MIR2110	MIR3120	MIR324	MIR374A	MIR4444-1	MIR4647
MIR1286	MIR181A2	MIR212	MIR3121	MIR326	MIR377	MIR4445	MIR4648
MIR1287	MIR181B2	MIR214	MIR3122	MIR329-1	MIR378A	MIR4446	MIR4651
MIR1288	MIR182	MIR215	MIR3125	MIR329-2	MIR378D2	MIR4448	MIR4653
MIR1289-2	MIR1825	MIR22	MIR3128	MIR335	MIR378E	MIR4449	MIR4655
MIR1290	MIR183	MIR221	MIR3130-2	MIR339	MIR378J	MIR4453	MIR4657
MIR1291	MIR184	MIR222	MIR3132	MIR33A	MIR382	MIR4457	MIR4658
MIR1292	MIR185	MIR223	MIR3133	MIR342	MIR3909	MIR4467	MIR4659A
MIR1293	MIR186	MIR2276	MIR3136	MIR345	MIR3912	MIR4469	MIR4663
MIR1294	MIR188	MIR2277	MIR3138	MIR346	MIR3922	MIR4470	MIR4664
MIR1296	MIR18A	MIR2278	MIR3140	MIR34A	MIR3926-1	MIR4479	MIR4665
MIR1302-11	MIR18B	MIR23A	MIR3142	MIR34B	MIR3936	MIR4485	MIR4668
MIR1302-5	MIR1908	MIR23B	MIR3144	MIR34C	MIR3940	MIR4489	MIR4672
MIR1303	MIR1909	MIR24-1	MIR3146	MIR3605	MIR3941	MIR4496	MIR4673
MIR1304	MIR190A	MIR24-2	MIR3150A	MIR3609	MIR3942	MIR4498	MIR4676
MIR1306	MIR191	MIR25	MIR3153	MIR3611	MIR3944	MIR4499	MIR4677
MIR1307	MIR1913	MIR2682	MIR3154	MIR3613	MIR3960	MIR449A	MIR4680
MIR130A	MIR1914	MIR26A1	MIR3155A	MIR3614	MIR3973	MIR449B	MIR4681
MIR130B	MIR1915	MIR26A2	MIR3157	MIR3615	MIR423	MIR449C	MIR4685
MIR132	MIR192	MIR26B	MIR3158-1	MIR3616	MIR424	MIR4512	MIR4688
MIR1322	MIR193A	MIR27A	MIR3160-1	MIR3618	MIR4257	MIR4515	MIR4690
MIR1343	MIR193B	MIR28	MIR3162	MIR362	MIR4258	MIR4517	MIR4691
MIR135B	MIR194-1	MIR2909	MIR3163	MIR3620	MIR4259	MIR4518	MIR4695
MIR138-1	MIR195	MIR296	MIR3165	MIR3651	MIR4263	MIR4519	MIR4699

MIR138-2	MIR196A1	MIR298	MIR3170	MIR3652	MIR4270	MIR451A	MIR4706
MIR140	MIR196A2	MIR29A	MIR3173	MIR3654	MIR429	MIR4523	MIR4707
MIR141	MIR196B	MIR29B1	MIR3176	MIR3657	MIR4292	MIR4524A	MIR4709
MIR142	MIR1976	MIR29B2	MIR3177	MIR3659	MIR4295	MIR4525	MIR4714
MIR143	MIR199A2	MIR29C	MIR3179-1	MIR365A	MIR4304	MIR4528	MIR4720
MIR145	MIR199B	MIR301A	MIR3179-4	MIR365B	MIR4307	MIR4533	MIR4721
MIR146A	MIR19A	MIR301B	MIR3181	MIR3662	MIR4320	MIR4534	MIR4723

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR4725	MIR494	MIR548C	MIR590	MIR6501	MIR6761	MIR6822	MIR6879
MIR4726	MIR496	MIR548D1	MIR591	MIR6502	MIR6763	MIR6824	MIR6882
MIR4727	MIR497	MIR548E	MIR592	MIR6504	MIR6765	MIR6825	MIR6883
MIR4738	MIR499A	MIR548H3	MIR593	MIR6505	MIR6766	MIR6826	MIR6884
MIR4741	MIR5000	MIR548J	MIR597	MIR6506	MIR6768	MIR6827	MIR6886
MIR4742	MIR5001	MIR548L	MIR599	MIR6508	MIR6770-3	MIR6829	MIR6888
MIR4743	MIR5003	MIR548M	MIR600	MIR6511B1	MIR6771	MIR6830	MIR6889
MIR4744	MIR5006	MIR548N	MIR603	MIR6512	MIR6773	MIR6833	MIR6893
MIR4747	MIR5008	MIR548O2	MIR607	MIR6513	MIR6775	MIR6834	MIR6894
MIR4748	MIR5009	MIR548S	MIR6070	MIR6514	MIR6776	MIR6835	MIR6895
MIR4749	MIR500A	MIR548V	MIR6079	MIR6516	MIR6778	MIR6836	MIR7-1
MIR4750	MIR500B	MIR550A1	MIR6084	MIR655	MIR6779	MIR6837	MIR7106
MIR4751	MIR501	MIR550A3	MIR609	MIR658	MIR6780A	MIR6842	MIR7108
MIR4755	MIR5010	MIR555	MIR611	MIR659	MIR6780B	MIR6843	MIR7109
MIR4756	MIR502	MIR558	MIR612	MIR660	MIR6781	MIR6844	MIR7110
MIR4760	MIR503	MIR5581	MIR6124	MIR664A	MIR6783	MIR6846	MIR7111
MIR4761	MIR504	MIR5582	MIR6125	MIR664B	MIR6785	MIR6847	MIR7114
MIR4762	MIR5047	MIR5585	MIR6132	MIR671	MIR6786	MIR6848	MIR7150
MIR4763	MIR505	MIR5586	MIR6133	MIR6719	MIR6789	MIR6849	MIR7158
MIR4764	MIR5088	MIR5587	MIR614	MIR6721	MIR6792	MIR6851	MIR7161
MIR4765	MIR5089	MIR559	MIR616	MIR6726	MIR6793	MIR6852	MIR7-2
MIR4766	MIR5090	MIR5590	MIR619	MIR6727	MIR6794	MIR6854	MIR7-3
MIR4769	MIR5091	MIR561	MIR620	MIR6728	MIR6797	MIR6855	MIR744
MIR4771-2	MIR5092	MIR562	MIR621	MIR6729	MIR6798	MIR6856	MIR761
MIR4774	MIR5094	MIR567	MIR623	MIR6732	MIR6799	MIR6857	MIR762
MIR4775	MIR511	MIR569	MIR624	MIR6733	MIR6800	MIR6859-1	MIR765
MIR4779	MIR5187	MIR5690	MIR625	MIR6734	MIR6801	MIR6859-3	MIR766
MIR4781	MIR5189	MIR5692B	MIR626	MIR6735	MIR6802	MIR6861	MIR769
MIR4782	MIR5193	MIR5695	MIR628	MIR6739	MIR6803	MIR6862-1	MIR7703
MIR4784	MIR532	MIR5697	MIR629	MIR6741	MIR6804	MIR6862-2	MIR7705
MIR4786	MIR544A	MIR5702	MIR630	MIR6743	MIR6805	MIR6864	MIR7843
MIR4789	MIR544B	MIR5706	MIR634	MIR6744	MIR6806	MIR6865	MIR7847
MIR4793	MIR548A3	MIR575	MIR636	MIR6745	MIR6810	MIR6866	MIR7851
MIR4795	MIR548AA2	MIR576	MIR637	MIR6747	MIR6811	MIR6867	MIR7854
MIR4796	MIR548AC	MIR579	MIR638	MIR6748	MIR6812	MIR6868	MIR7855

MIR4797	MIR548AH	MIR580	MIR640	MIR6749	MIR6814	MIR6869	MIR7856
MIR4803	MIR548AN	MIR581	MIR641	MIR6750	MIR6816	MIR6870	MIR8055
MIR4804	MIR548AQ	MIR582	MIR643	MIR6751	MIR6817	MIR6872	MIR8063
MIR484	MIR548AR	MIR583	MIR644A	MIR6753	MIR6818	MIR6873	MIR8064
MIR486-1	MIR548AT	MIR586	MIR646	MIR6755	MIR6819	MIR6874	MIR8072
MIR487B	MIR548AU	MIR588	MIR647	MIR6758	MIR6820	MIR6877	MIR8075
MIR491	MIR548B	MIR589	MIR648	MIR6759	MIR6821	MIR6878	MIR8077

**Anexo 9.** Lista de factores de transcripción (TFs) y microARNs (MIRs) identificados, en la lista de genes, en común, candidatos de compensación de dosis génica inducidos por el tratamiento con etopósido (continuación).

MIR8082	CREB1	MIR4779
MIR8085	GATA3	MIR5006
MIR8086	HNF4A	MIR548D1
MIR8485	JUN	MIR607
MIR873	MYB	MIR6731
MIR876	MYC	MIR6756
MIR877	NFKB1	MIR6766
MIR885	NR2F2	MIR6778
MIR887	PPARA	MIR6797
MIR889	RELA	MIR6851
MIR9-2	TP63	MIR6878
MIR922	LIST MIR	MIR8085
MIR92A1	MIR107	MIR9-1
MIR92A2	MIR10B	MIR9-2
MIR92B	MIR1233-1	MIR9-3
MIR93	MIR1233-2	
MIR937	MIR124-1	
MIR939	MIR124-2	
MIR940	MIR124-3	
MIR941-1	MIR129-1	
MIR941-2	MIR130A	
MIR941-3	MIR130B	
MIR941-4	MIR141	
MIR941-5	MIR199A2	
MIR942	MIR19A	
MIR943	MIR19B1	
MIR95	MIR200C	
MIR98	MIR21	
MIRLET7A1	MIR214	
MIRLET7A2	MIR22	
MIRLET7A3	MIR27A	
MIRLET7B	MIR301A	
MIRLET7C	MIR30C1	
MIRLET7D	MIR30C2	
MIRLET7E	MIR335	

MIRLET7F1	MIR33A
MIRLET7F2	MIR34A
MIRLET7G	MIR3671
MIRLET7I	MIR454
PPARA	MIR4647
LIST TF	MIR4651
AR	MIR4755