



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO  
**CARACTERIZACIÓN Y  
VALOR CLÍNICO DE LAS  
CÉLULAS TUMORALES  
CIRCULANTES EN  
PACIENTES CON CÁNCER  
DE MAMA TRIPLE  
NEGATIVO Y CÁNCER DE  
OVARIO AVANZADO**

Manuel Abreu Rodríguez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2019





CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

# CARACTERIZACIÓN Y VALOR CLÍNICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO Y CÁNCER DE OVARIO AVANZADO

D. Manuel Abreu Rodríguez

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 15 de Julio de 2019*

Fdo. D. Manuel Abreu Rodríguez





CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS**

### **CARACTERIZACIÓN Y VALOR CLÍNICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO Y CÁNCER DE OVARIO AVANZADO**

Dña. Laura Muínelo Romay  
Dña. Laura Sánchez Piñón  
D. Rafael López López

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. Manuel Abreu Rodríguez , bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 15 de Julio de 2019*

Fdo. Laura Muínelo Romay (Directora)

Fdo. Laura Sánchez Piñón (Directora y Tutora)

Fdo. D. Rafael López López (Director)



Yo, Manuel Abreu Rodríguez, autor de esta tesis, no cuento con conflictos de interés que declarar.



Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III  
(PI13/01388)







*A las pacientes y a sus familias*





*“Soñé un cuadro y luego pinté mi sueño”*  
***Vincent van Gogh***



# ÍNDICE

<b><u>1.INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>35</b>
<b>1.1 Cáncer de mama</b> .....	<b>38</b>
1.1.1 Subtipos de cáncer de mama.....	41
1.1.2 Cáncer de mama triple negativo.....	46
1.1.2.1 Clasificación.....	46
1.1.2.2 Epidemiología y características clínicas. ....	48
1.1.2.3 Características moleculares. ....	50
1.1.2.4 Alteraciones moleculares durante el proceso de metástasis.....	53
1.1.2.5 Alternativas terapéuticas.....	55
1.1.2.6 Retos para el manejo clínico del CMTN.....	61
<b>1.2 Cáncer de ovario</b> .....	<b>63</b>
1.2.1 Subtipos.....	63
1.2.2 Epidemiología.....	64
1.2.3 Características moleculares. ....	67
1.2.4 Alteraciones moleculares durante el proceso de metástasis.....	68
1.2.5 Alternativas terapéuticas.....	70
1.2.6 Retos para el manejo clínico del cáncer de ovario.....	73
<b>1.3 Células tumorales circulantes</b> .....	<b>79</b>
1.3.1 Técnicas de aislamiento y caracterización de CTCs.....	81
1.3.2 Transición epitelio mesénquima y CTCs.....	85
1.3.3 CTCs en tumores de mama triple negativo.....	86
1.3.4 CTCs en cáncer de ovario.....	90
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b> .....	<b>95</b>
<b><u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	<b>99</b>
<b>3.1 Cohortes de pacientes incluidas en el estudio</b> .....	<b>101</b>
<b>3.2 Modelos celulares</b> .....	<b>104</b>
3.2.1 Cultivo de células tumorales humanas de cáncer de mama y ovario.....	104
3.2.2 Silenciamiento de TIMP1 mediante shRNA.....	105

3.2.3 Tratamiento con inhibidores de la vía androgénica.....	106
3.2.4 Tratamiento con carboplatino y paclitaxel.....	106
<b>3.3 Análisis de la expresión génica.....</b>	<b>107</b>
3.3.1 Extracción de ARN total de tejido parafinaldos.....	107
3.3.2 Extracción de ARN total de líneas celulares.....	107
3.3.3 Extracción de ARN total de CTCs de pacientes.....	107
3.3.4 Retrotranscripción.....	107
3.3.5 Preamplificación.....	108
3.3.6 RT-q-PCR.....	109
<b>3.4 Aislamiento y contaje de CTCs.....</b>	<b>110</b>
3.4.1 Aislamiento mediante el kit CELLection Epithelial.....	110
3.4.2 Aislamiento y contaje mediante el sistema CellSearch.....	111
3.4.3 Aislamiento y recuperación de células puras mediante la tecnología DEPArray.....	112
<b>3.5 Análisis genómicos.....</b>	<b>113</b>
3.5.1 Amplificación de genoma completo mediante el kit Ampli1 WGA.....	113
3.5.2 Extracción de ADN total de tejidos parafinados.....	114
<b>3.6 Secuenciación masiva paralela dirigida.....</b>	<b>115</b>
3.6.1 Construcción de librerías.....	115
3.6.2 Preparación de los templates.....	116
3.6.3 Secuenciación.....	116
3.6.4 Análisis bioinformático.....	116
<b>3.7 Estudios proteicos.....</b>	<b>117</b>
3.7.1 Extracción de proteínas totales de las líneas celulares.....	117
3.7.2 Western-Blot.....	117
<b>3.8 Ensayos funcionales.....</b>	<b>119</b>
3.8.1 Ensayos funcionales <i>in vitro</i> .....	119
3.8.1.1 Ensayo de migración en <i>Transwell</i> .....	119
3.8.1.2 Ensayo de proliferación en placa.....	120
3.8.1.3 Ensayo de adhesión celular en placa.....	120
3.8.1.4 Ensayo de toxicidad con carboplatino y paclitaxel.....	121

3.8.1.5 Ensayo de formación de colonias en agar.....	121
3.8.2 Ensayos funcionales <i>in vivo</i> .....	122
3.8.2.1 Ensayos en pez cebra.....	122
3.8.2.1.1 Cuidado y cruce de pez cebra.....	122
3.8.2.1.2 Estudios de toxicidad en pez cebra.....	123
3.8.2.1.3 Ensayos de <i>xenograft</i> en pez cebra.....	123
3.8.2.1.4 Análisis de los embriones inyectados.....	125
3.8.2.2 Ensayos <i>xenograft</i> en modelos murinos.....	125
<b>3.9 Análisis estadístico.....</b>	<b>127</b>
<b><u>4. RESULTADOS</u>.....</b>	<b>129</b>
<b>4.1 Resultados CMTN.....</b>	<b>131</b>
4.1.1 Valor clínico del contejo de CTCs en pacientes con CMTN.....	131
4.1.1.1 Contaje de CTCs en pacientes con CMTN en estadios III y IV mediante la tecnología CellSearch.....	131
4.1.1.2 Asociación entre el número de CTCs y variables clínicas.....	133
4.1.1.3 Valor pronóstico del contejo de CTCs mediante el sistema CellSearch.....	133
4.1.2 Caracterización del perfil de expresión génica de CTCs de pacientes con CMTN.....	136
4.1.2.1 Cuantificación y caracterización de CTCs en pacientes con CMTN mediante RT-q-PCR.....	136
4.1.2.2 Estudio de correlación entre el número de CTCs obtenido con el sistema CellSearch y los niveles de los marcadores analizados mediante RT-q-PCR.....	142
4.1.2.3 Valor diagnóstico del panel de marcadores identificado en la población de CTCs.....	142
4.1.2.4 Valor pronóstico de los marcadores identificados en la población de CTCs.....	144
4.1.3 Validación de las potenciales dianas terapéuticas identificadas en CTCs de pacientes con CMTN.....	148

4.1.3.1 Validación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del bloqueo de la vía mediada por el receptor de andrógenos como estrategia terapéutica en CMTN.....	149
4.1.3.1.1 Impacto del bloqueo de la vía androgénica en la capacidad de proliferación, formación de colonias en agar y migración en la línea celular MDA-MB 231 .....	150
4.1.3.1.2 Estudio <i>in vivo</i> del efecto del bloqueo de la vía androgénica en la línea celular MDA-MB 231.....	151
4.1.3.1.3 Ensayo de toxicidad en respuesta a tratamiento con abiraterona y enzalutamida en pez cebra.....	152
4.1.3.1.4 Ensayo de proliferación y migración en pez cebra.....	152
4.1.3.2 Validación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la inhibición de TIMP1 como estrategia terapéutica en CMTN.....	155
4.1.3.2.1 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la expresión de marcadores de plasticidad celular en la línea MDA-MB 231....	156
4.1.3.2.2 Efecto del silenciamiento de TIMP1 en la capacidad de proliferación, clonogenicidad, invasión y adhesión de la línea MDA-MB 231.....	156
4.1.3.2.3 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la respuesta al tratamiento con carboplatino y paclitaxel.....	159
4.1.3.2.4 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la proliferación y migración de la línea celular MDA-MB 231 en pez cebra.....	161
4.1.3.2.5 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la proliferación y formación de metástasis de la línea MDA-MB 231 en un modelo murino.....	163
4.1.4 Análisis de las CTCs mediante secuenciación de nueva generación.....	166
4.1.4.1 Aislamiento de las CTCs mediante la tecnología DEPArray y amplificación del genoma completo.....	166
4.1.4.2 Análisis de las CTCs mediante secuenciación.....	168
<b>4.2 Resultados cáncer de ovario.....</b>	<b>177</b>
4.2.1 Valor clínico del conteo de CTCs en pacientes con cáncer de ovario.....	177
4.2.1.1 Características de las pacientes.....	177
4.2.1.2 Contaje de CTCs en pacientes con cáncer de ovario mediante la tecnología CellSearch: asociación con variables clínicas y valor pronóstico.....	177

4.2.2 Caracterización del perfil de expresión génica en CTCs de pacientes con cáncer de ovario.....	179
4.2.2.1 Cuantificación y caracterización de CTCs mediante RT-q-PCR..	179
4.2.2.2 Estudio de correlación entre el número de CTCs obtenido con es sistema CellSearch y los niveles de los marcadores analizados mediante RT-q-PCR.....	179
4.2.2.3 Valor diagnóstico del panel de expresión identificado en CTCs..	183
4.2.2.4 Correlación de los marcadores de CTCs con las variables clínicas y la supervivencia de las pacientes.....	184
4.2.3 Validación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la inhibición de TIMP1 como estrategia terapéutica en cáncer de ovario.....	185
4.2.3.1 Estudio <i>in vitro</i> del impacto del silenciamiento de TIMP1 en el fenotipo de la línea celular SKOV3.....	186
4.2.3.2 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la expresión de marcadores de plasticidad celular en la línea SKOV3.....	186
4.2.3.3 Efecto del silenciamiento de TIMP1 en la capacidad de proliferación, clonogenicidad, invasión y adhesión de la línea SKOV3...	187
4.2.3.4 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la proliferación de la línea SKOV3 en pez cebra.....	189
<b><u>5. DISCUSIÓN</u></b> .....	193
5.1 Valor del estudio de CTCs en pacientes con CMTN.....	196
5.2 Valor del estudio de CTCs en pacientes con cáncer de ovario.....	215
<b><u>6. CONCLUSIONES</u></b> .....	221
<b><u>7. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	225
<b><u>8. AGRADECIMIENTOS</u></b> .....	281
<b><u>9. ACLARACIONES</u></b> .....	285



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario.

**ADNtc:** ADN tumoral circulante.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**CBS:** Cirugía conservadora de mama.

**CDX:** Xenoinjerto derivado de células tumorales circulantes.

**CMC:** Célula madre cancerosa.

**CMTN:** Cáncer de mama triple negativo.

**CTC:** Célula tumoral circulante.

**EMT:** Transición epitelio mesénquima.

**FISH:** Fluorescencia por hibridación in situ.

**miARN:** Micro ARN.

**MMP:** Metaloproteinasas de matriz.

**OMS:** Organización mundial de la salud.

**SG:** Supervivencia global.

**SLP:** Supervivencia libre de progresión.

**TN:** Triple negativo.

**RTU:** Listo para usar.

**AKT2:** Quinasa serina treonina 2.

**AKT3:** Quinasa serina treonina 3.

**ALDH1:** Aldehido deshidrogenasa 1

**ALDH2:** Aldehido deshidrogenasa 2.

**AML2:** Gen asociado a leucemia mieloide aguda 2.

**ANGTPL4:** Proteína 4 de tipo angiopoyetina.

**ANXA2:** Anexina 2.

**APOA1:** Apolipoproteína A1.

**AR:** Receptor de andrógenos.

**ARID1A:** Factor de remodelación de cromatina P250.

**ATM:** Quinasa serina treonina ATM.

**B7H4:** Proteína co-estimuladora inmune B7-H4

**BCL11A:** Proteína de leucemia/linfoma de célula B 11A.

**BCL2:** Proteína reguladora de apoptosis BCL2.

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro.

**BRAF:** Proto-Oncogen *BRAF*.

**BRCA1:** Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama y ovario 1.

**BRCA2:** Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama y ovario 2.

**CA125:** Mucina 16.

**CA15.3:** Mucina 1.

**CCNA2:** Ciclina A2.

**CCND1:** Ciclina D1.

**CCNE1:** Ciclina E1.

**CCNE2:** Ciclina E2.

**CD117:** Grupo de diferenciación 117. Kit.

**CD133:** Grupo de diferenciación 133. Prominina 1.

**CD24:** Grupo de diferenciación 24.

**CD44:** Grupo de diferenciación 44.

**CD45:** Grupo de diferenciación 45. Antígeno común leucocitario.

**CD49F:** Grupo de diferenciación 49F. Integrina alfa 6.

**CDH1:** E-Cadherina.

**CDH12:** N-Cadherina.

**CDKN2A:** Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 2A.

**CDP1:** Proteína integral de membrana de Golgi 6.

**CK:** Citoqueratina.

**CK17:** Citoqueratina 17.

**CK18:** Citoqueratina 18.

**CK19:** Citoqueratina 19.

**CMYC:** Factor de transcripción P64.

**COX2:** Cicloxigenasa 2.

**CRIPTO1:** Factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma 1.

**CTLA4:** Proteína asociada a linfocito T citotóxico 4.

**CTNNB1:**  $\beta$  catenina 1.

**CX26:** Proteína de uniones GAP  $\beta$ 2.

**CXCL12:** Factor de estimulación de crecimiento de células pre-B.

**CXCR4:** Proteína asociada a lipopolisacáridos 3.

**DKFZ:** Molécula DKFZp762E1312.

**ECAD:** E-Cadherina.

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**EMP2:** Proteína epitelial de membrana 2.

**EPCAM:** Molécula de adhesión de célula epitelial.

**ERCC1:** Proteína de reparación de ADN por excisión 1.

**EREG:** Epirregulina.

**ET1:** Endotelina 1.

**ETV5:** ETS variante 5.

**FGFR1:** Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 1.

**FGFR2:** Receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 2.

**FOLR1:** Receptor de folato 1.

**FOXA1:** Proteína caja de horquilla A1.

**FOXM1:** Proteína caja de horquilla M1.

**FUT8:** Fucosiltransferasa 8.

**GAPDH:** Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

**GDF1:** Factor de crecimiento y diferenciación 1.

**GTSE1:** Proteína expresada en fase S y G2.

**HE4:** Proteína principal epidídimo específica E4.

**HER2:** Receptor epidérmico humano de factor de crecimiento 2.

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos.

**IBP4:** Proteína de unión reguladora de interferón factor 4.

**IGF1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

**IGFR1:** Receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1.

**IL6:** Interleuquina 6.

**ILQ:** Isoliquiritigenina.

**INPP4B:** Inositol fosfato 4 fosfatasa tipo II B.

**KIT:** Grupo de diferenciación 117.

**KLK4:** Calicleína 4.

**KLK6:** Calicleína 6.

**KLK7:** Calicleína 7.

**KRAS:** Proteína homóloga del oncogén de sarcoma viral de rata Kirsten.

**LIV1:** Proteína de la familia de portadores de soluto 39 miembro 6.

**LOXL2:** Proteína relacionada con lisil oxidasa 2

**MAFK:** Factor de transcripción MAF BZIP factor K.

**MEK:** Proteína quinasa activada por mitógeno 7.

**MELK:** Leucina embriónica materna quinasa en cremallera.

**MET:** Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos.

**MLK3:** Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno 11.

**MMP1:** Metaloproteinasa de matriz 1.

**MMP2:** Metaloproteinasa de matriz 2.

**MTOR:** Diana de Rapamicina en mamíferos.

**MUC1:** CA15.3.

**MUC16:** CA125.

**NANOG:** Factor de transcripción NANOG.

**NFKB:** Factor nuclear kappa B.

**NOTCH:** Proteínas transmembrana NOTCH.

**NOTCH1:** Proteína transmembrana de la familia NOTCH variante 1.

**OCT4:** Factor de transcripción de unión a octámeros 3.

**PARP1:** Polimerasa Poli (ADP-Ribosa) 1.

**PARP2:** Polimerasa Poli (ADP-Ribosa) 2.

**PD1:** Proteína de muerte celular programada 1.

**PDGFRA:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa.

**PDL1:** Ligando de proteína de muerte celular programada 1.

**PI3K:** Subunidad catalítica delta de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa.

**PIK3CA:** Subunidad catalítica delta de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa.

**PK2M:** Proquinetina 2M.

**PPIC:** Peptidi lpropil Isomerasa C.

**PTEN:** Homólogo de fosfatasa y tensina.

**RAS:** Proteínas G de la familia RAS.

**RB1:** Proteína asociada a retinoblastoma 1.

**ROCK:** Proteína quinasa en espiral de bobina asociada a Rho.

**SIP1:** Proteína asociada a Gem 2.

**SLC6A8:** Proteína de la familia de portadores de soluto 6 miembro 8.

**SLUG:** Represor transcripcional de la familia Snail 2.

**SNAIL1:** Represor transcripcional de la familia Snail 1.

**SNAIL2:** Represor transcripcional de la familia Snail 2.

**SOX2:** Factor de transcripción SOX2.

**SREBP2:** Factor de transcripción de unión al elemento de regulación de esterol 2.

**$\beta$ 2M:**  $\beta$  2 microglobulina.

**STAT3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3.

**TGF $\beta$ :** Factor de crecimiento transformador  $\beta$ .

**TIEG1:** Factor de tipo Kruppel 10.

**TIMP1:** Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1.

**TP53:** Proteína supresora de tumores P53.

**TRKB:** Receptor neurotrópico tirosín quinasa 2.

**TWIST:** Factor de transcripción de la familia BHLH 1.

**USP2:** Enzima des-ubiquitinante 2.

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular A.

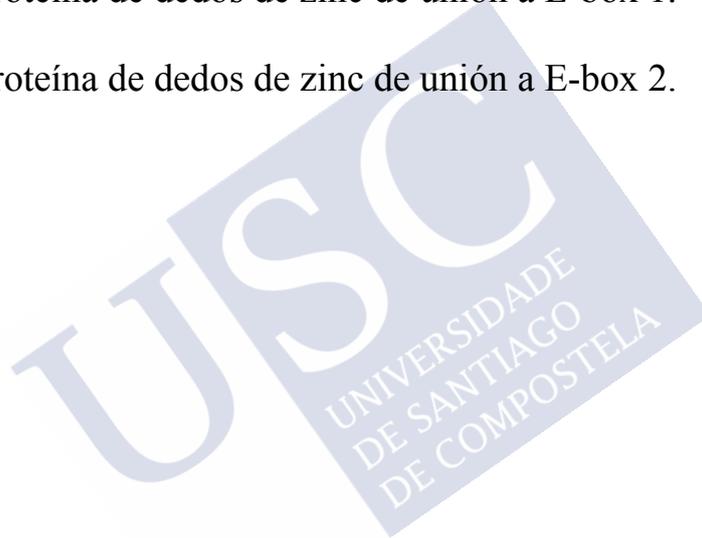
**VEGFR:** Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular A.

**VIM:** Vimentina.

**WT1:** Proteína tumoral de Wilms1.

**ZEB1:** Proteína de dedos de zinc de unión a E-box 1.

**ZEB2:** Proteína de dedos de zinc de unión a E-box 2.





## RESUMEN

En los últimos años, se han producido continuos avances en la prevención, diagnóstico y tratamiento relacionados con el manejo de los tumores de mama y ovario. A pesar de ello, éstos siguen estando entre los tumores que afectan a mujeres con mayor prevalencia, en el caso del de mama y con mayor agresividad, en el caso de ovario, presentándose este último como el tumor ginecológico que más muertes causa.

En el presente trabajo tratamos de identificar marcadores tumorales con valor diagnóstico y pronóstico, así como dianas terapéuticas con utilidad en cáncer de mama triple negativo (CMTN) y cáncer de ovario. Para ello analizamos la población de células tumorales circulantes (CTCs) presente en la sangre de las pacientes, prestando especial atención a marcadores implicados en plasticidad celular, como vía complementaria al tradicional estudio de muestras de tejido y con el objetivo de proporcionar nuevas herramientas clínicas que mejoren la esperanza de vida de estas pacientes.

Para realizar el estudio, se recogieron muestras de sangre periférica con el fin de llevar a cabo el conteo de CTCs mediante la tecnología CellSearch y en paralelo un inmunoaislamiento mediante el uso de Dynabead conjugadas con anticuerpos anti-EPCAM, para su posterior caracterización transcriptómica mediante RT-q-PCR.

La cohorte de pacientes incluidas en el estudio centrado en CMTN incluyó 32 pacientes, 23 de ellas estadio IV y 9 estadio III de las que se recogieron muestras a diagnóstico y/o en el momento de la recurrencia. Por otro lado, la cohorte de ovario incluyó 38 pacientes con tumores de alto grado en los que se recogió la muestra a diagnóstico o en el momento de la recurrencia.

En relación a los resultados de enumeración obtenidos en los dos tipos de tumores es importante destacar que el 41% y 21% de las pacientes con CMTN y cáncer de ovario incluidas en el presente

estudio presentaron, respectivamente, al menos 1CTC/7,5ml de sangre. Además, aquellas pacientes con niveles superiores a 5CTCs/7,5ml de sangre o presencia de *clusters* de CTCs presentaron peores tiempos de supervivencia, tanto global (SG) como libre de progresión (SLP), demostrando su valor como marcador pronóstico.

Por otro lado, mediante la caracterización molecular de las CTCs presentes en las muestras de ambos tipos de tumores, observamos una gran plasticidad celular. En el caso de las CTCs de las pacientes con CMTN esta población circulante se caracterizó por la expresión de *CDH1* y *EPCAM*, *VIM*, *SNAIL1*, *TIMP1*, *CRIP1*, *CD49F*, *ALDH2*, *CD44*, *BCL11A* y *AR*, demostrando la convivencia de marcadores epiteliales, mesenquimales y de célula madre. Este fenotipo de plasticidad se evidenció también en las muestras de pacientes con cáncer de ovario mediante la expresión *MUC1*, *CK19*, *TIMP1*, *CXCR4*, *CD24* y *CD44*. Respecto a este fenotipo intermedio o de plasticidad, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la transición de características epiteliales a mesenquimales induce la aparición de propiedades de célula madre en las células tumorales de origen epitelial, siendo estos fenotipos híbridos o intermedios los vinculados a una mayor capacidad metastásica. Este estado intermedio o de plasticidad se considera más habitual que la transición completa de un fenotipo epitelial a mesenquimal y se ha descrito previamente en la población de CTCs en distintos tipos de tumores, asociándose a una mayor capacidad de estas células para formar metástasis.

Es importante destacar también que en el presente estudio hemos podido aumentar el porcentaje de detección de CTCs mediante nuestro protocolo de aislamiento y detección indirecta con respecto al sistema CellSearch. El mejor modelo para la detección de CTCs en CMTN fue el formado por los marcadores *TIMP1*, *SNAIL1* y *BCL11A* y el mejor modelo para la detección de CTCs en cáncer de ovario el formado por *GAPDH*, *TIMP1*, *CK19* y *MUC1*.

Por otro lado, en cuanto al impacto clínico del aislamiento y caracterización transcriptómica de la población de CTCs de la cohorte

TN de nuestro estudio, debemos destacar también que la presencia de niveles elevados de algunos de los marcadores se asoció con peores tasas de supervivencia, en términos de SG (*CD49F*, *ALDH2*, *CD44*, *TIMP1* y *GAPDH*) y SLP (*CD49F*, *TIMP1* y *GAPDH*).

Otro de los objetivos del presente trabajo fue la identificación de potenciales dianas terapéuticas a través de la caracterización de las CTCs de las pacientes. Para ello, de la firma de marcadores presentes en esta población circulante de ambos tumores se seleccionó uno de ellos, *TIMP1*, para una mayor caracterización mediante estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*. Seleccionamos este marcador debido a su importante expresión diferencial entre controles y pacientes, por su impacto en SG y SLP y por la reciente bibliografía que asocia niveles elevados de *TIMP1* con un peor pronóstico en distintos tipos de tumores. En nuestro estudio demostramos que su silenciamiento en las líneas tumorales MDA-MB 231 (modelo de CMTN) y SKOV3 (modelo de cáncer de ovario) reduce la proliferación celular y aumenta la capacidad de adhesión a matrices de colágeno *in vitro* en ambas líneas celulares. El descenso en la capacidad proliferativa de ambas líneas silenciadas para este gen también se observó al analizar su comportamiento en un modelo de pez cebra. Además, el silenciamiento de *TIMP1* en la línea MDA-MB 231 suprimió la aparición de metástasis pulmonares en un modelo ortotópico murino, demostrando la importancia de este gen en la biología de las CTCs y el proceso de diseminación metastásica.

Además del estudio del papel de *TIMP1* en CMTN, también se analizó en más detalle el impacto del bloqueo de la actividad de la vía del *AR* por su interés como diana terapéutica. Parte de los tumores TN presentan alta expresión de *AR*, constituyendo una interesante diana molecular para su tratamiento, pero su papel en el resto de tumores TN no está suficientemente explorado. Por ello, en el presente trabajo se estudió el impacto del tratamiento con abiraterona y enzalutamida en el comportamiento de la línea MDA-MB 231, observando una reducción de la proliferación celular tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* utilizando el modelo de pez cebra.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en la caracterización funcional de TIMP1 y el AR evidencian el interés del estudio de la población de CTCs en pacientes con ambos tipos de tumores para comprender mejor cuales son los actores que están mediando el proceso de carcinogénesis y diseminación tumoral.

Finalmente, para completar nuestra estrategia de estudio de las CTCs de las pacientes CMTN, se llevó a cabo un estudio de caracterización genómica en el que se comparó la población circulante y el tejido tumoral de 4 pacientes. Para ello se realizó un aislamiento de CTCs a nivel de célula única mediante el uso de la tecnología DEPArray, para su posterior análisis mediante un panel de secuenciación que incluyó un total de 163 genes. Los genes más frecuentemente mutados en las cuatro pacientes fueron *TP53*, *PIK3CA*, *NOTCH2* y *BRCA2*. Todos ellos son genes habitualmente mutados en tumorales TN. En 3 de las pacientes se encontraron mutaciones comunes entre tejido y CTCs, siendo el porcentaje de concordancia más alto del 50. Es importante destacar que los resultados de este estudio confirmaron la presencia de una importante heterogeneidad molecular entre las distintas CTCs presentes en las pacientes, pero también entre esta población circulante y los correspondientes tejidos tumorales (tumor primario o metástasis). Por lo tanto, demostramos que este tipo de análisis constituye una herramienta de gran valor para poder llevar a cabo el genotipado dinámico y no invasivo del tumor, teniendo en cuenta la heterogeneidad molecular presente en la mayoría de los tumores y cuyo impacto en la evaluación de la enfermedad puede ser muy importante.

Globalmente podemos decir que los resultados del presente trabajo demuestran el valor del estudio de la población tumoral circulante de pacientes con CMTN y cáncer de ovario avanzado para establecer nuevas opciones de diagnóstico, pronóstico y tratamiento en ambos tipos de tumores, constituyendo una estrategia de gran relevancia para acercar la oncología de precisión a estas pacientes.



# INTRODUCCIÓN



# 1-INTRODUCCIÓN

A pesar de los continuos avances en prevención, diagnóstico y tratamiento, los tumores de mama y ovario siguen estando entre los tumores que afectan a mujeres con: mayor prevalencia en el caso de mama (28%) y con mayor agresividad en el caso de ovario, presentándose como el tumor ginecológico que más muertes causa (Galceran et al., 2017).

Siendo dos tipos de tumores con distinto origen y con datos de incidencia, mortalidad y respuesta a terapia diferentes, presentan ciertas similitudes y mecanismos moleculares comunes. Así, por ejemplo, las mutaciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* son las más comunes y mejor definidas en su relación con el desarrollo de la forma hereditaria de este tipo de tumores, estando presentes en un 5-15% del total de los tumores de mama y ovario. Ambos pertenecen al grupo de genes denominados supresores de tumores y participan en el crecimiento celular, la división celular y la reparación del ADN mediante recombinación homóloga de alta fidelidad (Alhuqail et al., 2018; Anders, Abramson, Tan, & Dent, 2016). Mutaciones en estos genes pueden dar lugar a una incapacidad para reparar el ADN que puede desembocar principalmente, en el desarrollo de tumores de los tipos mencionados. El riesgo de desarrollar este tipo de tumores es del 39-60% en portadores de mutaciones en *BRCA1* y del 10-27% en portadores de mutaciones en *BRCA2* (G. Liu et al., 2012).

Otras características comunes entre el cáncer de mama y ovario (principalmente el de ovario del tipo seroso) son: la no amplificación de *RBI* y *CCNE1*, la alta expresión de *AKT3*, la amplificación y la alta expresión de *CMYC* y la alta frecuencia de mutaciones en *P53*. Estas características comunes sugieren que ambos tipos de tumores pueden estar dirigidos parcialmente por eventos comunes y, por lo tanto, en algunos casos podrían considerarse aproximaciones terapéuticas comunes para combatirlos (Cancer Genome Atlas Network et al., 2012).

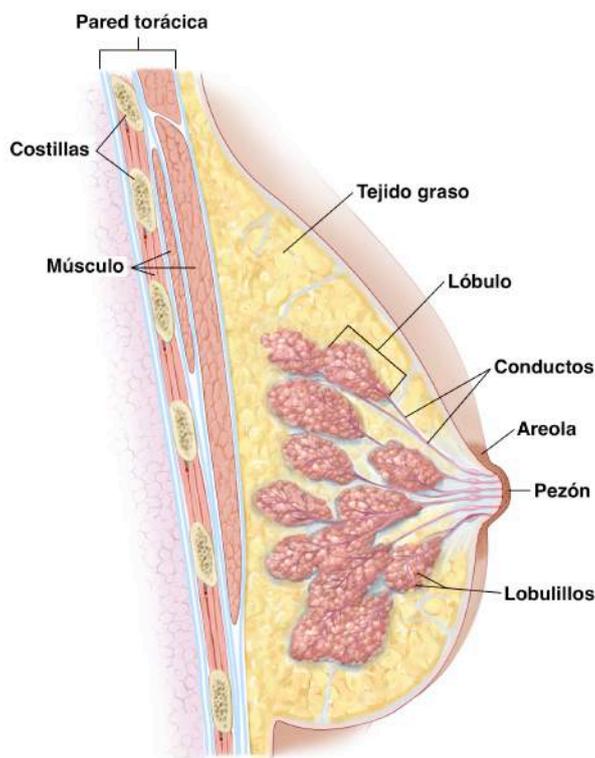
En el presente trabajo tratamos de identificar marcadores tumorales y dianas terapéuticas para ambos tumores a través del estudio de la población de CTCs presentes en la sangre de las pacientes, como vía alternativa y complementaria al tradicional estudio de muestras de tejido y con el objetivo de proporcionar nuevas herramientas clínicas que mejoren la esperanza de vida de estas pacientes.

## **1.1 CÁNCER DE MAMA**

Las mamas son órganos iguales, simétricos y glandulares situados en la parte frontal superior del pecho. Se encuentran constituidas por diferentes tipos de tejido, que van desde un tejido muy denso al tejido adiposo que rodea la glándula, proporcionándole consistencia y volumen. Estructuralmente está formada por gran cantidad de alvéolos que se unen formando los lóbulos (15-50) y lobulillos donde se produce la leche. A su vez éstos están unidos por una serie de tubos denominados ductos o conductos galactóforos que llevan la leche hasta el pezón (Bland & E., 2007) (Figura 1).

La glándula mamaria está irrigada mediante vasos sanguíneos y vasos linfáticos, que son los encargados de recoger la linfa. Dichos vasos linfáticos desembocan en ganglios linfáticos situados en la axila y a ambos lados del esternón (Bland & E., 2007).

Las mamas son el órgano que más cambios sufre desde el nacimiento hasta la edad adulta. Crecen durante la pubertad bajo la acción de las hormonas femeninas (estrógenos y progesterona) posteriormente, durante la edad reproductiva se ven influenciadas por el ciclo menstrual para que finalmente, en la menopausia, gran parte de la glándula mamaria se atrofie y sea remplazada por tejido adiposo (Bland & E., 2007).



**Figura 1: Anatomía de la mama. Adaptada de Terese Winslow LLC Medical and Scientific Illustration. Con autorización de Terese Winslow.**

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común y la segunda causa de muerte de mujeres en los países desarrollados. Presenta su mayor pico de incidencia entre los 45 y 50 años y la OMS estima que en 2020 una de cada ocho mujeres desarrollarán un cáncer de mama (Teles RHG, Morales HF, 2018). Es importante destacar también que la supervivencia a 5 años en cáncer de mama es del 98% en enfermedad localizada, del 84% en enfermedad regional, pero de sólo el 23% en enfermedad metastásica. Además, un cuarto de los pacientes con cáncer de mama localizado y la mitad de las mujeres con afectación en ganglios axilares sufren una recaída (Howlander N, Krapcho M, Miller D, 2015).

Al considerar el riesgo de padecer cáncer de mama hemos de recordar que la mayoría de las mujeres que lo desarrollan no presentan factores de riesgo muy evidentes, ni tampoco antecedentes familiares. Sin embargo, existen ciertos factores que pueden aumentar la posibilidad de desarrollar un tumor de mama:

- **Edad.** El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta con la edad, presentándose en la mayoría de los casos en mujeres de más de 50 años (K. N. Anderson, Schwab, & Martinez, 2014).
- **Antecedentes personales.** Una mujer que ha tenido cáncer en una mama presenta un riesgo aumentado de presentar un nuevo tumor de mama (K. N. Anderson et al., 2014).
- **Antecedentes familiares.** El riesgo de padecer cáncer mama se ve aumentado si tienen algún pariente de primer grado o varios de segundo grado a los que se le ha diagnosticado cáncer de mama u ovarios. Si algún familiar ha desarrollado cáncer en las dos mamas. Si tiene un pariente hombre que haya desarrollado cáncer de mama. (K. N. Anderson et al., 2014).
- **Susceptibilidad genética:** Principalmente las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Bane, Dushanthi, & Andrulis, 2013).
- **Exposición a estrógeno y progesterona.** Las mujeres que han tenido la primera menstruación antes de los 11 años y/o llegaron a la menopausia después de los 55 tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de mama ya que sus células mamarias han estado expuestas a dichas hormonas durante más tiempo (Elsawaf et al., 2013; McDonald, 2018).
- **Raza y origen étnico:** Las mujeres de raza blanca tienen más probabilidades de desarrollar cáncer de mama que las mujeres de raza negra, pero entre las mujeres menores de 45 años, la enfermedad es más frecuente en las mujeres de raza negra que

en las de raza blanca. Las mujeres de ascendencia judía o de Europa del Este presentan también un mayor riesgo ya que son más propensas a presentar mutaciones en *BRCA* (McDonald, 2018).

- **Hiperplasia atípica de la mama:** Las mujeres diagnosticadas de esta anomalía presentan también un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama (Vierkant et al., 2017).
- **Carcinoma lobulillar *in situ*.** Las mujeres diagnosticadas de esta patología presentan un riesgo aumentado de padecer un futuro tumor invasivo en cualquiera de las mamas (K. Mao et al., 2017).
- **Factores del estilo de vida.** Distintos factores como el peso elevado, la baja actividad física, la mala alimentación y el consumo excesivo de alcohol pueden contribuir al desarrollo de cáncer de mama (Chaveepojnkamjorn, Thotong, Sativipawee, & Pitikultang, 2017).
- **La radiación.** Las mujeres que hayan estado expuestas a radiación ionizante presentan un riesgo aumentado de padecer un cáncer de mama (Juerß et al., 2017).

### 1.1.1 Subtipos de cáncer de mama

Este tumor se clasifica molecularmente en cinco subtipos con distinto pronóstico clínico y tratamiento (Perou, 2010) (Figura 2).

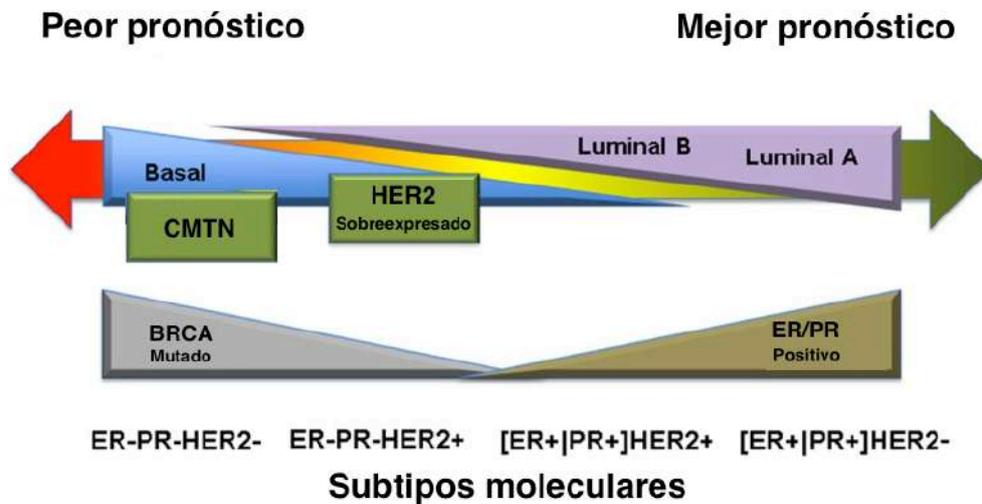


Figura 2: Subtipos moleculares de tumores de mama. Adaptado de (Dai et al. 2015). Con autorización de la editorial Century Ed.

**Luminal.** Los tumores luminales son el tipo más común dentro de los tumores de mama. Expresan receptores de estrógenos (ER del inglés *estrogen receptor*) y progesterona (PR del inglés *progesteron receptor*), unidos a un perfil de expresión derivado del componente luminal epitelial de la mama. Este perfil incluye la expresión de citoqueratinas (CKs) luminales 8/18, receptor de estrógenos y genes relacionados con su activación como *LIVI* y *CCND1* (Abd El-Rehim et al., 2005; Perou et al., 2000).

Dentro de los tumores luminales existen dos subtipos: **luminal A** y **luminal B**. Los tumores del subtipo luminal A son positivos para los receptores de estrógenos y progesterona, negativos para HER2 y presentan una alta expresión de genes relacionados con la vía del receptor de estrógenos. Los del subtipo luminal B son positivos tanto para los receptores hormonales como para HER2 y presentan una mayor expresión de genes relacionados con proliferación como Ki67. Los tumores del subtipo luminal B tienden a ser de mayor grado que los del subtipo luminal A (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001).

Según indican los datos más recientes el 83% de los tumores de mama invasivos pertenecen al subtipo luminal (71% luminal A y 12% luminal B) (Nasrazadani, Thomas, Oesterreich, & Lee, 2018). En general los tumores luminales tienen un buen pronóstico aunque los del subtipo B tienen peor pronóstico que los del subtipo A (Sørli et al., 2001). Así por ejemplo, los tumores luminales presentan en general una buena respuesta a la terapia hormonal aunque la respuesta a quimioterapia no es tan buena (Brenton, Carey, Ahmed, & Caldas, 2005). Los tumores del subtipo luminal A pueden tratarse mediante terapia endocrina, mientras que los del subtipo luminal B, más proliferativos, pueden beneficiarse de la terapia combinada de quimioterapia y tratamiento hormonal. Otras estrategias terapéuticas dirigidas como la terapia anti-angiogénica, los inhibidores de mTOR y la terapia anti-HER2 son también efectivas en tumores luminales (Brenton et al., 2005).

**HER2 sobre-expresado.** Este tipo de tumores se caracterizan por no presentar expresión de receptores hormonales (ER<sup>-</sup> y PR<sup>-</sup>) y presentar, como su nombre indica, sobre-expresión de HER2. Se identifican mediante el uso de *arrays* de expresión, mediante inmunohistoquímica o FISH, aunque los tumores clasificados mediante estos sistemas no siempre tienen total concordancia ya que los HER2 positivos no siempre muestran cambios a nivel transcripcional (Vallejos et al., 2010). Entre el 40% y el 80% de este tipo de tumores portan mutaciones en *P53* y suelen ser de grado 3 (Dai, Chen, & Bai, 2014; Perou et al., 2000). Es interesante destacar que no se ha encontrado asociación entre la raza o la edad y la presencia de tumores con HER2 sobre-expresado (O'Brien et al., 2010), así como con los factores principales factores de riesgo para el cáncer de mama (Brenton et al., 2005; Colditz, Rosner, Chen, Holmes, & Hankinson, 2004).

En cuanto a la respuesta a terapia, aunque los tumores con sobre-expresión de HER2 presentan un mal pronóstico, son sensibles a la quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos, mostrando una respuesta patológica completa significativamente buena, en

comparación con los tumores de mama luminales. El mal pronóstico de este tipo de tumores, así como de los del subtipo basal, se debe al alto riesgo de recurrencia temprana entre los pacientes en los cuales la erradicación de células tumorales no ha sido completa. Este tipo de tumores son los que obtienen un mayor beneficio de los avances en quimioterapia (Brenton et al., 2005; Sørlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003).

Existen agentes moleculares dirigidos como el anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Trastuzumab) disponibles para el tratamiento de este tipo de tumores, aunque no todos responden bien a esta terapia. Por ejemplo, está descrito que la baja expresión de *PTEN* y la sobre-expresión de *CXCR4* están implicadas en la resistencia a dicho tratamiento dirigido (Brenton et al., 2005; Nagata et al., 2004).

**Basal.** El subtipo basal se define principalmente por la expresión de marcadores propios tanto de las células epiteliales basales, como de las células mioepiteliales normales de la mama y también por la muy baja o ausente expresión de receptores hormonales y HER2 (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) (Perou et al., 2000). Estos patrones de expresión incluyen la alta expresión de marcadores basales como las *CK 5, 6, 14, 17, EGFR* y de genes relacionados con la proliferación como *FOXM1* y *CCNA2* (Perou et al., 2000; Sotiriou et al., 2003). Los tumores caracterizados por la alta expresión de *CK* basales presentan más probabilidades de tener una baja expresión de *BRC1*, una mayor probabilidad de presentar mutaciones en *P53* y suelen ser de grado 3 (Abd El-Rehim et al., 2005; O'Brien et al., 2010; Sørlie et al., 2001).

En comparación con los otros subtipos, estos tumores se asocian a pacientes de menor edad y son más comunes en mujeres afroamericanas, especialmente entre pre-menopáusicas (Carey et al., 2006). Al contrario que los tumores del subtipo luminal A, en los cuales tener varios hijos y tener el primer embarazo a una edad temprana son factores protectores, estos factores incrementan el riesgo de padecer tumores basales (Colan, Ho-Yen, 2012). Además, este tipo

de tumores se asocian a una supervivencia menor y a un alto riesgo de recurrencia local y regional. El patrón de metástasis también separa los tumores basales del resto de tumores de mama, con una mayor tendencia a afectar a órganos viscerales y menos posibilidad de afectar ganglios linfáticos (Colan, Ho-Yen, 2012). Este subtipo de tumores también presentan un crecimiento muy rápido (Colan, Ho-Yen, 2012). Así, el tamaño de los tumores basales es, en general, mayor que el de los otros subtipos, con un tamaño medio de 2 cm (Rakha et al., 2006). La gran mayoría de estos tumores no son susceptibles de ser tratados con las terapias dirigidas convencionales, dejando a la quimioterapia como única opción terapéutica. Dos estudios independientes sobre la quimioresistencia de este tipo de tumores coinciden en su sensibilidad a quimioterapéuticos convencionales como la antracilina y los taxanos, concluyendo que su mal pronóstico no está dirigido por la quimiorresistencia inicial sino por las pocas opciones de tratamiento disponibles (Brenton et al., 2005). Distintos estudios han propuesto potenciales dianas moleculares que pueden estar jugando un papel importante en este subtipo tumoral, entre los que destacan *EGFR*, genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular como las metaloproteinasas y genes relacionados con la angiogénesis como *VEGFR* y *VEGF* (H. Y. Chang et al., 2005; Nielsen et al., 2004). Todos ellos presentan gran interés como dianas terapéuticas.

Dentro de los tumores del subtipo basal, entre un 70% y un 90% son **tumores TN** (Fan et al., 2006; Swenson et al., 2009). Estos tumores son de especial interés ya que presentan un curso clínico muy agresivo y hoy en día no cuentan con ninguna terapia sistémica dirigida.

**Baja expresión de Claudina:** Son tumores muy parecidos a los basales, cuya característica diferencial es la muy baja expresión de varios genes de la familia de las claudinas, principalmente la 3, 4 y 7. Prácticamente la totalidad de los tumores con baja expresión de claudina son también **tumores TN** pero, sin embargo, una minoría de los tumores de mama TN son bajos en claudina. Otra característica importante de este tipo de tumores es su alta infiltración tumoral

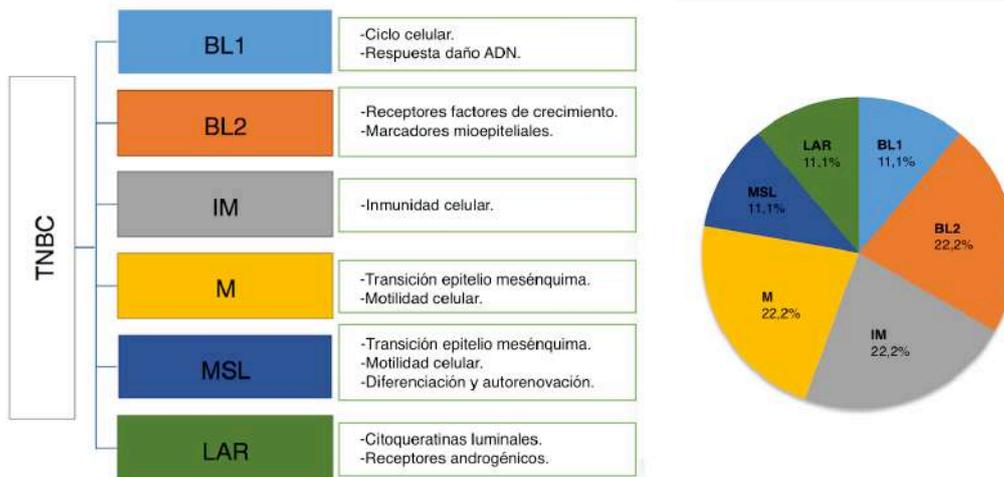
linfocitaria (Perou, 2010), que los hace especialmente atractivos para tratamientos basados en inmunoterapia.

### 1.1.2 Cáncer de mama triple negativo

Existe una clasificación sencilla, basada solamente en la expresión de receptores hormonales y HER2 la cual encuadra al CMTN de una forma inequívoca. Este tipo de tumores de mama se definen por la falta de expresión de receptores hormonales, concretamente una expresión menor al 1% por inmunohistoquímica y la no presencia de sobre-expresión de HER2, con un valor de expresión menor al 3% por inmunohistoquímica o un ratio FISH menor de 2.0 (Anders et al., 2016). Es importante destacar que no hay ningún tipo de terapia dirigida aprobada contra este tipo de tumores y por lo tanto existe la clara necesidad de mejorar el conocimiento sobre las características y el comportamiento de los tumores de mama TN, con el objetivo de ampliar las opciones terapéuticas disponibles para las pacientes (Saraiva, Guadalupe Cabral, Jacinto, & Braga, 2017).

#### 1.1.2.1 Clasificación

Gracias a recientes estudios sobre perfil de expresión en pacientes con CMTN, se han podido establecer **seis subtipos principales** con diferente biología y respuesta a tratamiento: Basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), inmunomodulatorio (IM), mesenquimal (M), mesenquimal *stem-like* (MSL) y luminal con receptor de andrógenos expresado (LAR) (Lehmann et al., 2011) (Figura 3). Los tumores BL se caracterizan por una alta frecuencia de reordenamientos cromosómicos, inestabilidad genómica y mutaciones en *BRCA*. En particular los tumores BL1 se encuentran frecuentemente enriquecidos en genes relacionados con ciclo celular y de respuesta a daño en el ADN lo cual justifica su sensibilidad a agentes como los platinos. Por otra parte los tumores BL2 sobre-expresan frecuentemente receptores de factores de crecimiento y marcadores mioepiteliales presentando una menor probabilidad de respuesta frente a quimioterapia (Lehmann et al., 2011).



**Figura 3: Subtipos moleculares de CMTN y sus características.**

Los subtipos M y MSL se caracterizan por la expresión de genes de vías relacionadas con la motilidad celular y la transición epitelio mesénquima (EMT), proceso vital durante el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos en el adulto. Estos subtipos mesenquimales presentan repuesta al inhibidor de las quinasas ABL/SCR Dasatinib y a inhibidores de PI3K/mTOR. Los tumores del subtipo LAR presentan expresión de citoqueratinas luminales y expresión de receptores androgénicos, lo cual les confiere sensibilidad a antagonistas del receptor de andrógenos como la bicalutamida y la enzalutamida. Finalmente, los tumores IM se encuentran enriquecidos en genes relacionados con el proceso de inmunidad celular y se consideran el subtipo más prometedor para ser tratado mediante inmunoterapia. Esta clasificación molecular presenta no solo un valor predictivo sino también un valor pronóstico, ya que se ha observado una diferencia significativa en supervivencia libre de progresión (SLP) entre subtipos moleculares. Sin embargo, no se han observado diferencias en términos de aparición de metástasis (Lehmann et al., 2011).

### 1.1.2.2 Epidemiología y características clínicas

Los tumores de mama TN representan entre el 10-20% del total de los casos de cáncer de mama (Kumar & Aggarwal, 2016) y tienen peor pronóstico que los tumores con expresión de receptores hormonales o HER2 (Dent et al., 2007; Onitilo, Engel, Greenlee, & Mukesh, 2009). Aproximadamente, el número de muertes causadas a nivel mundial por cáncer de mama ronda las 500.000, de las cuales 170.000 (alrededor del 30%) son casos de CMTN (Howlander N, Krapcho M, Miller D, 2015). El mayor riesgo de recaída tras cirugía se encuentra en el tercer año y a partir de dicha recaída el pronóstico clínico empeora considerablemente debido a que la supervivencia tras la aparición de metástasis se reduce mucho (Kumar & Aggarwal, 2016).

Teniendo en cuenta la edad de diagnóstico, se observa que el CMTN presenta una distribución bimodal con un primer pico de incidencia en mujeres pre-menopáusicas, seguido de un segundo pico en mujeres de más de 70 años de edad. Por otra parte, cuando se comparan pacientes de ambos grupos con el mismo estadio se observa que el pronóstico del grupo de mujeres pre-menopáusicas es considerablemente peor (Abulkhair, Moghraby, Badri, & Alkushi, 2012; W. F. Anderson, Chatterjee, Ershler, & Brawley, 2002; Lund et al., 2009; Muguti, 1993). Se cree que CMTN pre-menopáusicas es una enfermedad dirigida por pocas y muy relevantes moléculas, mientras que los tumores TN geriátricos presentan una mayor inestabilidad cromosómica, característica esencial de los tejidos senescentes y de los tumores geriátricos en general (Curtin et al., 2005). Esta heterogeneidad entre tumores de mujeres con distinta edad ha sido confirmada mediante estudios de secuenciación de alta profundidad (Curtis et al., 2012; Stephens et al., 2009).

Los tumores de mama TN presentan una considerable heterogeneidad clínica dependiendo de la raza, además de la edad (Tabla 1). Las mujeres jóvenes de ascendencia africana presentan un riesgo tres veces mayor de padecer este tipo de tumores

independientemente de los factores de riesgo para el cáncer de mama (Stead et al., 2009). Por ejemplo, en un estudio epidemiológico realizado en población nigeriana se describió que el 59% de los casos de cáncer de mama en su país eran TN (Huo et al., 2009). Es importante destacar también que las mujeres africanas presentan estadios más avanzados a diagnóstico, ratios de crecimiento elevados, resistencia a quimioterapia y mayor tendencia a la formación de metástasis viscerales, principalmente en hígado y cerebro (Honorio & Guerra Pereira, 2016).

**Tabla 1: Heterogeneidad clínica, epidemiológica y terapéutica del CMTN.**

CARACTERÍSTICAS	PEOR PRONÓSTICO	MEJOR PRONÓSTICO
Edad de diagnóstico	Joven	Mayor
Estadio de presentación	Avanzado	Temprano
Ratio de crecimiento	Rápido	Lento
Localización Primera Metástasis	Hígado y Cerebro	Ganglios y hueso
Respuesta a quimioterapia	Resistente	Sensible
Índice de masa corporal	Alto	Bajo
Raza	Africana	Caucásica

Otra de las características ya mencionada de los tumores de mama TN, es que tienen un fenotipo muy agresivo, presentándose con frecuencia como metastásicos a fecha de diagnóstico, causando lesiones locales del alto grado y un desarrollo temprano de metástasis después de la terapia adyuvante (Collett et al., 2005; Seewaldt & Scott, 2007; Vona-Davis et al., 2008). Además, este tipo de tumores generan frecuentemente metástasis viscerales, principalmente en hígado, pulmón y cerebro (Anders & Carey, 2009; Gadiyaram et al., 2009; Tsang, Li, Lai, Au, & Chua, 2009), aunque en ocasiones presentan un patrón de metástasis más similar a los tumores luminales, desarrollando solamente metástasis ganglionares y óseas (Wei et al., 2008). Estos tumores son también heterogéneos en cuanto al tiempo de recurrencia. A diferencia de los tumores con receptor de estrógenos positivo, cuya curva de recurrencia es lineal, los tumores TN presentan un mayor ratio de recurrencia en los primeros 5 años, observándose dos picos de recurrencia principales (Lee et al., 2009;

W.-J. Yin et al., 2009); el ya mencionado a los 3 años y el patrón de recurrencia tardía, asociado con una enfermedad menos agresiva vinculada a la aparición de metástasis óseas (Dent et al., 2007; Wei et al., 2008) (Figura 4). Estas diferencias observadas en el curso clínico de este tipo de tumores pueden ser debidas, en cierta medida, a la diferente edad de incidencia de la enfermedad (Tse et al., 2009).

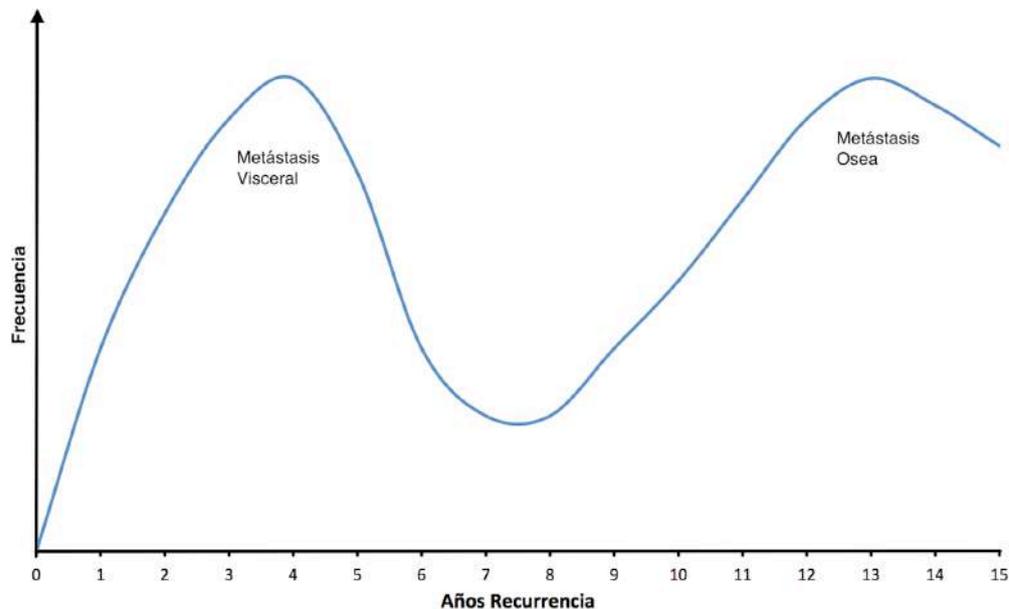


Figura 4: Patrón de recurrencia del CMTN.

### 1.1.2.3 Características moleculares

Al igual que otros tipos de cáncer de mama, los tumores TN han sido uno de los focos de estudio del proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). En este análisis a gran escala se analizaron diferencias en número de copias y en el patrón de metilación además de llevar a cabo secuenciación de exoma y transcriptoma, secuenciación de miARN y proteómica. Tras este análisis se pusieron de manifiesto los siguientes datos característicos de tumores TN: (1) presentan una muy alta frecuencia de mutaciones en *P53*, aproximadamente un 80% de los casos; (2) presentan frecuentemente inactivación de *RBI* y *BRC1*; (3) tienen una alta actividad de la vía PI3K causada principalmente por mutaciones de *PIK3CA* e inactivación/delección de

*INPP4B* y/o *PTEN*; (4) presentan una importante actividad proliferativa, principalmente dirigida por la hiperactivación de *FOX1M*; (5) presentan de una gran similitud con los tumores de ovario del tipo seroso, incluyendo alta frecuencia de mutación de *ATM* y *P53*, alta expresión de *AKT3* y *MYC*, inactivación de *BRCA1*, *BRCA2* y *RBI* y amplificación de la *CCNE1*; (6) presentan una alta inestabilidad genómica y (7) tienen una mayor presencia de hipometilación en comparación con otros tumores de mama. Por otra parte, el análisis del número de copias reveló distintas amplificaciones y deleciones. Las principales amplificaciones incluyen *PIK3CA* (49%), *KRAS* (32%), *BRAF* (30%), y *EGFR* (23%). Se observaron otras amplificaciones menos comunes en *FGFR1*, *FGFR2*, *IGFR1*, *KIT*, *MET* y *PDGFRA*. Las principales deleciones, como ya se ha citado, son en *PTEN* e *INPP4B*, promoviendo la activación de la vía PI3K (Cancer Genome Atlas Network et al., 2012) (Figura 5).

Por otra parte, la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina se encuentra muy activa en los tumores de mama TN y específicamente más activa en los tumores de pacientes africanas (King, Suto, & Li, 2012; Wend et al., 2013). Lindner y colaboradores describieron que en pacientes de raza africana estos tumores presentan más actividad de las vías de señalización relacionadas con factores de crecimiento, como IGF1 y VEGF (Lindner et al., 2013). Aunque está descrito que la señalización a través de IGF1 se encuentra aumentada en individuos obesos, lo cual no fue controlado en este estudio, y las mujeres africanas presentan un mayor índice de masa corporal que las caucásicas. De hecho, un estudio llevado a cabo en el estado de Carolina, estableció la relación entre obesidad y los tumores de mama TN (Carey et al., 2006). En otro estudio de 2016, se relacionó la activación de las vías que regulan CRIPTO1, Notch/CLS y Wnt/ $\beta$ -catenina en CMC (células madre cancerosas) de mama con la adquisición de un fenotipo EMT y la formación de células iniciadoras de tumores de mama TN, las cuales presentan la capacidad para dirigir la progresión y la invasión tumoral (Rangel et al., 2016). Asimismo, Ben-Porath y colaboradores describieron que la expresión conjunta de los marcadores asociados a EMT y características *stem*,

*NANOG/OCT4/SOX2* se encuentra directamente asociada con la presencia de tumores de TN de alto grado (Ben-Porath et al., 2008).

Otros estudios también han puesto de manifiesto el marcado fenotipo mesenquimal de los tumores TN. Así, por ejemplo, recientemente se ha descrito la alta expresión nuclear de *SNAIL2* y de *TWIST* y su correlación positiva con la expresión nuclear de *VIM* y negativa con la expresión de *ECAD* en membrana. Estos datos sugieren que EMT y la adquisición de un fenotipo *stem*, juegan un papel muy importante en el CMTN (S. Zhou et al., 2018).

Por otro lado, se ha descrito que en CMTN la proporción de las poblaciones de CMC, tanto  $CD24^-/CD44^+$  como  $ALDH^+$ , está aumentada. Este aumento se postula como uno de los factores que pueden causar la resistencia a terapia en este tipo de tumores (Shima, Yamada, Ishikawa, & Endo, 2017). En un estudio reciente, se caracterizó transcripcionalmente la población ( $ALDH^+/CD24^-/CD44^+$ ) CMC. En esta población, con potencial tumorigénico y migratorio muy elevado (Ginestier et al., 2007), encontraron tres potenciales marcadores pronósticos (P4HA2, PTGR1 y RAB40B) que se relacionaban en las CMC con la capacidad de proliferación y formación de mamíferas y la capacidad proliferativa en líneas celulares de CMTN (M. Liu et al., 2018). Por otra parte, Wang y colaboradores, analizado por inmunohistoquímica biopsias de tejido de 145 pacientes con CMTN demostraron que las pacientes con marcaje  $CD24^-/CD44^+$  presentaban un significativo peor pronóstico (H. Wang et al., 2017). En otra corte de 160 pacientes con CMTN también se asociaron niveles altos de CD44 con un mal pronóstico (Collina et al., 2015). *ALDH1*, otro marcador *stem*, fue estudiado mediante *microarrays* de tejido en una corte de 192 pacientes de Uganda y se detectó en un 48% de los tumores, presentando una correlación muy alta con el grado tumoral, reforzando la idea de la importancia de los marcadores *stem* en el CMTN (Nalwoga, Arnes, Wabinga, & Akslen, 2010).

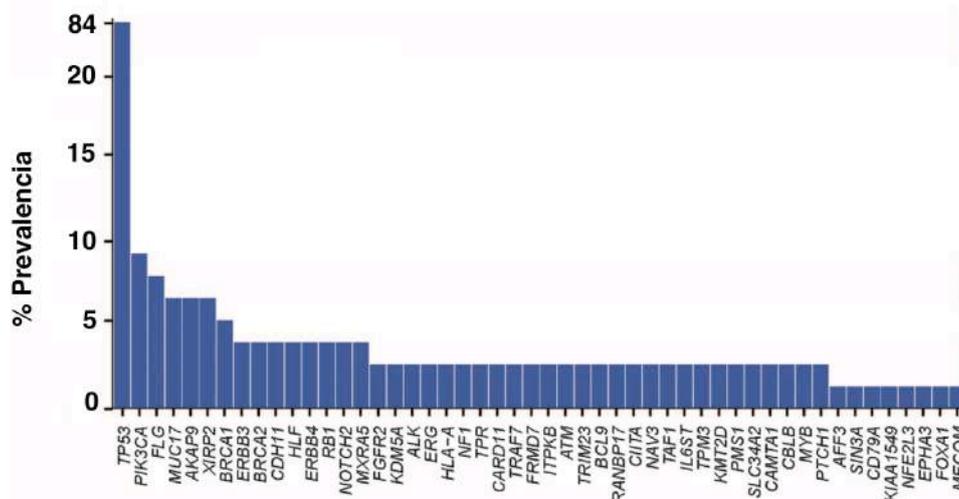
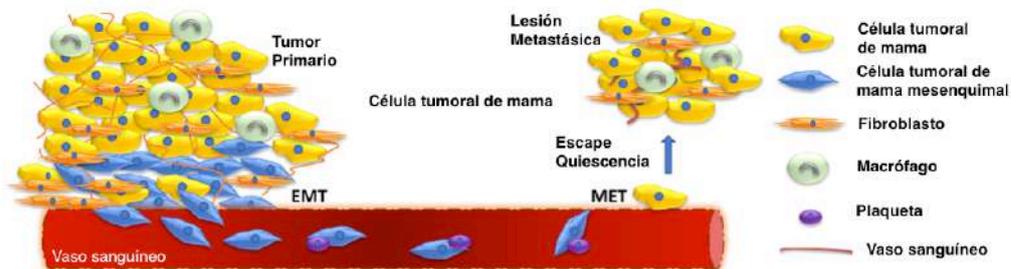


Figura 5: Genes más frecuentemente mutados en CMTN.

#### 1.1.2.4 Alteraciones moleculares durante el proceso de metástasis

En relación al proceso de metástasis, Neophytou y colaboradores han descrito una serie de genes implicados en cada una de las etapas de proceso metastásico en pacientes con cáncer de mama y especialmente en CMTN (Figura 6).

El proceso de **intravasación**, por el cual las células tumorales llegan a la circulación sanguínea tras liberarse del tumor primario, está dirigido por los principales reguladores de EMT como *SLUG*, *SNAIL* y *TWIST*. La vía de TGF- $\beta$  juega un papel crucial en esta etapa induciendo la sobre-expresión de *MAFK* y, por tanto, activando el proceso de EMT. A su vez el eje EMT-*SMAD*, en el que se encuentra implicado *WAVE3*, controla EMT mediante la regulación de la expresión de *SLUG*, *SNAIL* y *TWIST* o mediante el silenciamiento epigenético de genes epiteliales como *CDH1*. Por otra parte, la activación de *CXCR4* vía *CXCL12* o *ANGTPL4* induce la activación de las vías reguladas por *Mlk3* y *Erk1/2*, promoviendo la intravasación. Asimismo, se ha descrito que la expresión de supresores de metástasis como *TP63*, *LIFR*, *LOXL4*, *FOXF2*, *SSBP1*, *RAB1B* y *TIEG1* inhiben dicho proceso de intravasación (Neophytou, Boutsikos, & Papageorgis, 2018).



Invasión local e intravasación	Supervivencia en circulación	Extravasación	Colonización metastásica	Órgano
ANGPTL2, CDCP1, COX2, CXCL12, CXCR4, EREG, FSCN, IRAK1, MAFK, MLK3, NOS, NOTCH1/2, OPN, PKCA/i, PML, PTK6, RAD51, RAGE, RANKL, SLUG, SNAIL, SPRY1, TGFB1, TWIST, WAVE3, WNT1, ΔNp63, FOXF2, LIFR, TP63, RAB1B, SSBP1, TXNIP	TRKB, VCAM1	ANGPTL2, ANGPTL4, CDCP1, COX2, CXCL12, CXCR4, EREG, FSCN, IRAK1, IL13Rα2, MAFK, MLK3, NOS, NOTCH1/2, PKCA/i, PML, RAD51, RAGE, RANKL, ST6GALNAC5, TGFB1, WAVE3, WNT1, ΔNp63, FOXF2, LIFR, TP63, RAB1B, SHARP1, SSBP1, TIEG1, TXNIP	LDH, PCDH7, CX43, SERPINS	
			CDCP1, CXCL1/2, CYR61, FGFR, ID1, ID3, MYOF, POSTN, RAGE, S100A7, TGFB1, TNC, VCAM1, WNT1, LIFR, SDPR, TXNIP	
			ANGPTL2, CSF2, LPA, PTHrP, RANKL, TGFB1, VCAM, WNT1	

Figura 6: Esquema del proceso de metástasis y principales genes implicados en cada una de las etapas. Adaptado de (Neophytou et al. 2018). Con autorización de Creative-Commons.

Durante la etapa de **supervivencia en circulación** el receptor TRKB inhibe el proceso de *anoikis* mediante la vía de PI3K/Akt y también regula la interacción entre la célula tumoral y las células endoteliales mediante su activación BDNF dependiente. Por otra parte, se sabe que la unión de la célula tumoral a plaquetas es también importante para su supervivencia en circulación. En el proceso de **extravasación** se encuentran implicados muchos de los genes inductores del proceso de intravasación, ya que ambos procesos son considerados inversos. Durante el proceso de extravasación TGF-β induce la expresión a *ANTGPL4* a través de la vía de Smad. Los altos niveles de *ANTGPL4* incrementan la retención de las células tumorales mediante la disrupción de las uniones entre células

endoteliales, facilitando de este modo el paso transendotelial de las mismas. Por otra parte, se ha descrito que otras moléculas como *EREG*, *COX2*, *MMP1* y *MMP2* promueven la extravasación pulmonar ya que tras su silenciamiento se elimina de forma casi completa la aparición de metástasis pulmonares. En cuanto al proceso de **anidamiento a distancia** es de gran importancia el restablecimiento del fenotipo epitelial, mediado en parte por la acción de miR-200 que inhibe la expresión de *ZEB1* y *SIP1*, promoviendo de este modo la colonización metastásica. A su vez, las quimioquinas CXCL1/2 promueven las metástasis pulmonares mediante la atracción de células mieloides al área tumoral, produciendo el aumento de las proteínas de unión a calcio de bajo peso molecular S100A8/9, que promueven la supervivencia de las células tumorales mediante su unión a RAGE. Otra proteína de esta familia, S100A7, incrementa el ratio de crecimiento tumoral y la formación de metástasis, también mediante su unión a RAGE. Se ha descrito también que FGFR promueve la colonización metastásica pulmonar mediante la vía de PI3K/Akt. Es importante señalar, que aunque algunos de los genes se relacionan exclusivamente con la metástasis en CMTN, como por ejemplo *TIEG1*, *MAFK* y *MLK3*, la gran mayoría están también relacionados con otros tipos de tumores, sugiriendo su papel más fundamental en la progresión tumoral (Neophytou et al., 2018).

### **1.1.2.5 Alternativas terapéuticas**

Cuando los clínicos se enfrentan a un caso de CMTN, su actuación se ve limitada a la cirugía y a la administración de radioterapia y quimioterapia, a las cuales no responden todos los pacientes (Eralp et al., 2008; H. S. Kim, Lee, Lim, Kang, & Kim, 2011; Wysocki, Korski, Lamperska, Zaluski, & Mackiewicz, 2008). A continuación (Figura 7), se describen con más detalle las distintas opciones terapéuticas que existen en la actualidad para tratar a pacientes con CMTN:

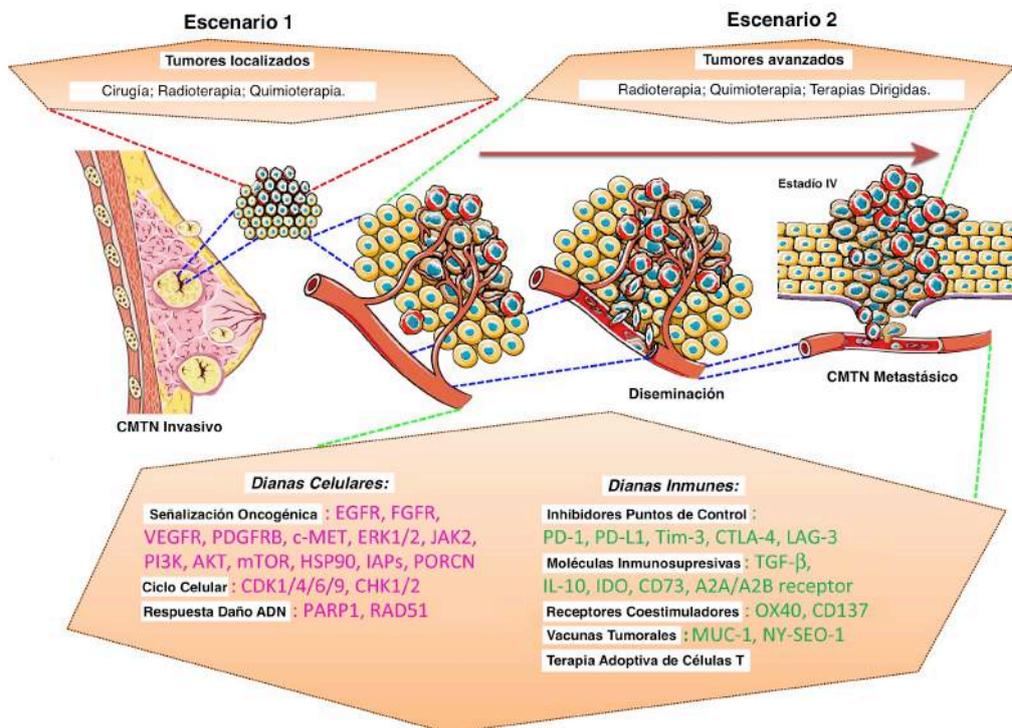


Figura 7: Alternativas terapéuticas para el tratamiento del CMTN. Adaptado de (Kalimutho et al. 2015). Con autorización de CellPress.

**Cirugía:** Se llevaron a cabo varios estudios para determinar si pacientes con CMTN se podrían beneficiar de la mastectomía en vez de la lumpectomía. Los resultados indicaron que, aunque el CMTN se asocia con una edad más joven y tumores de grado más alto, esto no afecta la elección del tratamiento quirúrgico ya que la tasa de recidiva local después de sufrir una cirugía conservadora de mama no es más alta en CMTN que en otros subtipos de cáncer de mama (Freedman, Anderson, Li, & Nicolaou, 2009).

**Radioterapia:** Tradicionalmente, la radioterapia se administra en CMTN, tal y como hace en otros subtipos de cáncer de mama, después de la cirugía conservadora. Ya que los tumores de mama TN crecen rápidamente y son localmente agresivos, la cirugía conservadora seguida de radioterapia en etapa temprana, puede no ser equivalente a la mastectomía, como sucede en otros tipos de cáncer de mama (Panoff et al., 2011). Sin embargo, las mujeres con CMTN con

mutaciones en *BRCA1* son potencialmente muy radiosensibles. En estas mujeres si la cirugía conservadora es seguida por radioterapia, la mama y el tejido circundante podrían erradicar los focos tumorales deficientes en *BRCA1* y, por lo tanto, disminuir la posibilidad de una recidiva local (Abdulkarim et al., 2011).

**Quimioterapia:** Los tumores de mama TN presentan una buena respuesta a quimioterapia en comparación con otros tipos de cáncer, pero su pronóstico sigue siendo peor ya que adquieren una rápida resistencia a tratamiento (Ismail-Khan & Bui, 2010). En estas pacientes se ha demostrado que la administración en adyuvancia de quimioterapia con dosis densa, administrando el tratamiento en un espacio corto de tiempo para conseguir una máxima muerte tumoral, da buenos resultados, aunque su beneficio en neoadyuvancia ha de ser estudiado con más detalle (Petrelli et al., 2015; Reinisch, Ataseven, & Kümmel, 2016).

Es importante destacar que hoy en día la quimioterapia basada en **taxanos** y **antraciclinas** continúa siendo el tratamiento universal en neoadyuvancia y adyuvancia para todos los tipos de tumores de mama TN (Omarini et al., 2018), aunque también existen otras opciones de tratamiento. Por ejemplo, tumores TN *BRCA* mutados presentan alta sensibilidad a agentes que inducen daño en el ADN (Stefansson, Villanueva, Vidal, Martí, & Esteller, 2012), por lo que son buenos candidatos a tratamientos con platinos. Pero, a pesar de que el beneficio del tratamiento basado en platinos ha sido investigado en diferentes estudios en pacientes con tumores TN, el mejor agente, la mejor combinación y la mejor secuencia de administración basada en platinos siguen sin estar claros (X. Chen et al., 2014; Hurley et al., 2013; G von Minckwitz & Martin, 2012).

Dentro de los taxanos que se utilizan en pacientes con CMTN están, por ejemplo, la doxorubicina, el paclitaxel y el nab-paclitaxel (paclitaxel ligado a nanopartículas de albúmina). Existe evidencia del beneficio clínico del uso de nab-paclitaxel en sustitución de paclitaxel en pacientes con CMTN. En dos ensayos clínicos en fase III, en

neoadyuvancia, se describió una significativa mejora de respuesta en pacientes CMTN tratados con nab-paclitaxel semanal en comparación con los tratados con paclitaxel semanal (Gianni et al., 2018; Untch et al., 2016). Además, en pacientes con CMTN metastásico tratadas con nab-paclitaxel, tanto administrado individualmente como en combinación con otros quimioterápicos, se observó un aumento en SLP en comparación con pacientes tratadas con taxanos (Gianni et al., 2018; Kojima et al., 2018).

Por otro lado, el beneficio de la terapia basada en antraciclinas en CMTN ha sido probado en diferentes estudios en neoadyuvancia (Omarini et al., 2018), sin embargo, los datos sobre su beneficio en adyuvancia son más diversos. Por ejemplo, en el ensayo clínico WSG 01, en pacientes con CMTN jóvenes tratadas con quimioterapia de dosis densa tradicional y con antraciclinas combinadas con ciclofosfamida, las tratadas con antraciclinas y ciclofosfamida alcanzaron una SLP del 71% a 5 años, mientras que las pacientes tratadas con quimioterapia de dosis densa tradicional alcanzaron solamente un 26% (Gluz et al., 2009).

Finalmente existen otros agentes que también han demostrado eficiencia en pacientes con CMTN como la erbulina, aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico tras al menos dos ciclos con una antraciclina y un taxano (Seetharam, Kolla, & Chawla, 2018), o la capecitabina, que en combinación con taxanos y antraciclinas puede ser particularmente efectivo en pacientes con tumores de mama TN (Joensuu et al., 2010; Verma, Provencher, & Dent, 2011).

**Terapias dirigidas:** A pesar de no contar con tratamientos dirigidos claros, tal y como pasa en los tumores luminales, hay distintas dianas moleculares cuyo bloqueo parece dar resultados positivos en pacientes con CMTN. Algunos de ellos se detallan a continuación.

**Inhibidores del PARP-1:** PARP-1 es una enzima conocida por su implicación en la reparación del ADN por escisión de bases, la cual

juega un papel crucial en la reparación de las roturas en el ADN de cadena simple (Alli, Sharma, Sunderesakumar, & Ford, 2009; Hastak, Alli, & Ford, 2010). Un ensayo clínico en fase II ha demostrado la eficacia del uso de gemcitabina combinada con carboplatino y el inhibidor de PARP-1, Iniparib (Telli et al., 2015), en neoadyuvancia, aunque debido a otros estudios con resultados negativos su utilidad clínica continúa en fase de estudio (Omarini et al., 2018).

**Anti-EGFR:** Este receptor de membrana tirosina quinasa se encuentra localizado en la superficie celular e induce proliferación celular, angiogénesis e inhibición de la apoptosis (Herbst, 2004; Siziopikou & Cobleigh, 2007; H. Zhang et al., 2007). Entre el 27% y el 57% de los tumores de mama TN presentan alteraciones en EGFR (Bidard et al., 2007). Distintos estudios clínicos han sugerido su potencial como marcador predictivo y pronóstico. Además, se ha descrito que el uso de anticuerpos anti-EGFR en líneas celulares de CMTN reduce la actividad tumoral y la migración celular (Ferraro et al., 2013). Basado en dicha evidencia, un ensayo clínico multicéntrico en fase II evaluó la expresión de EGFR en 60 pacientes con CMTN en estadios II y III, confirmando su valor predictivo de respuesta a quimioterapia combinada con panitumumab (anticuerpo anti-EGFR), sugiriendo el potencial beneficio de la terapia anti-EGFR en combinación con quimioterapia para este subgrupo de pacientes (Nabholtz et al., 2014).

**Anti-angiogénicos:** El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a las principales isoformas de VEGF, provocando la inhibición de la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la supervivencia celular (Greenberg & Rugo, 2010). Este agente ha sido testado en estadios tempranos y avanzados de cáncer de mama, mostrando un incremento en el ratio de respuesta, principalmente en pacientes con tumores de mama TN (Liedtke et al., 2008; O'Shaughnessy et al., 2010; Thomssen et al., 2012; Gunter von Minckwitz et al., 2012, 2014). Este incremento en el ratio de respuesta ha sido confirmado además en dos ensayos clínicos multicéntricos (Earl et al., 2015; Sikov et al., 2015). Sin embargo, hoy en día el uso

de Bevacizumab en neoadyuvancia sigue sin ser recomendado, principalmente por la ausencia de un incremento en supervivencia (Omarini et al., 2018).

**Inhibidores de mTOR:** Esta proteína es una serina/treonina quinasa intracelular que regula rutas de señalización implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular. Es importante comentar que distintos estudios indican que la activación de mTOR puede causar resistencia a cisplatino, fenómeno que podría revertirse mediante el uso de Everolimus, el cual es un inhibidor de mTOR. Por lo tanto, el uso de Everolimus en combinación con Cisplatino, podría ser indicado en pacientes con CMTN (Beuvink et al., 2005).

**Inmunoterapia:** Junto con los tumores HER2 positivos, los TN son los tumores de mama con mayor inestabilidad genómica (Hu et al., 2009). Por otro lado, en tumores TN hay trabajos en donde se ha descrito que la expresión proteica de PDL1 tiene valor para predecir si habrá respuesta patológica completa bajo el tratamiento de distintos quimioterápicos (Denkert et al., 2015) y que su porcentaje de expresión es superior al descrito para otros tumores, por lo que constituye una diana inmunológica de gran interés en este subtipo tumoral. En este sentido, resultados preliminares presentados en ASCO 2017 sugieren una prometedora actividad antitumoral del pembrolizumab (anti-PDL1) combinado con la quimioterapia neoadyuvante tradicional (Peter Schmid, Yeon Hee Park, Eva Muñoz-Couselo, Sung-Bae Kim, Joohyuk Sohn, 2017). Hoy en día, hay distintos ensayos clínicos en marcha con el fin de evaluar el beneficio de la inmunoterapia en estadios tempranos de CMTN en combinación con diferentes regímenes de quimioterapia neoadyuvante tradicional (Omarini et al., 2018). Los resultados de estos estudios se esperan con gran interés.

### 1.1.2.6 Retos para el manejo clínico del CMTN

Tal y como se ha comentado, los tumores TN representan un subtipo pequeño y heterogéneo dentro del cáncer de mama, con pocas alternativas terapéuticas. Por ello es de gran importancia el desarrollo de nuevas aproximaciones para su manejo clínico, a través de la búsqueda de marcadores que mejoren su diagnóstico, pronóstico y monitorización, así como nuevas dianas y estrategias terapéuticas.

Hoy en día se utiliza el CA15.3 para la monitorización de respuesta a terapia y para la detección temprana de recidivas. Este marcador presenta grandes limitaciones para el diagnóstico, ya que puede encontrarse elevado en multitud de contextos no neoplásicos. Es importante destacar que las nuevas técnicas de estudio de “biopsia líquida” con las que podemos analizar las CTCs, en las que se centra el presente trabajo, o el ADN libre en circulación (ADNtc), están mostrando resultados esperanzadores para detectar enfermedad mínima residual y predecir el riesgo de recurrencia en estadios no metastásicos (Y.-H. Chen et al., 2017; Riva et al., 2017; Yan et al., 2017).

En cuanto a la identificación de dianas terapéuticas, distintos estudios han propuesto nuevas moléculas o vías *driver*, pero que aún están en una fase inicial de validación. Por ejemplo, Rangel y colaboradores determinaron el potencial valor como dianas terapéuticas de las vías de señalización de CRIPTO1, Notch/CLS y Wnt/ $\beta$ -catenina para tratar de eliminar a las células iniciadoras de tumores que se consideran las principales causantes que inician y promueven la diseminación tumoral y la recurrencia en CMTN (Rangel et al., 2016). También se ha descrito la sobre-expresión de *BCL11A* en CMTN. Esta proteína, relacionada con propiedades de célula madre, parece estar jugando un papel importante en el este tipo de tumores, por lo que podría constituir una vía de tratamiento interesante para explorar (Khaled et al., 2015). Otras moléculas como USP2, CDP1, GTSE1, KLK4 o CX26 han sido propuestas como interesantes dianas terapéuticas en CMTN en base a su sobreexpresión

en tejido y su asociación a una mayor agresividad del tumor (Qu et al., 2015; Thiagarajan et al., 2018; Turdo et al., 2016; F. Yang et al., 2017)

Los mencionados avances, tanto en descubrimiento de nuevos marcadores, como de nuevas estrategias terapéuticas, han permitido el desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales, algunas como el uso de inmunoterapia, inhibidores de PARP, platinos o inhibidores de mTOR, están siendo investigados en ensayos clínicos para el manejo de pacientes con tumores TN. A su vez, la investigación se está centrando en la optimización de los tratamientos tradicionales, para poder ser aplicados a los pacientes y tumores que puedan obtener un mayor beneficio de los mismos y en el estudio de nuevas drogas aplicadas a subgrupos de pacientes estratificados molecularmente (Sharma, 2016). Es también relevante el estudio de la interacción tumor-estroma para el diseño y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Yeung et al., 2015). Por último, es de gran importancia señalar que el aumento de los estudios centrados en CTCs y ADNtc mediante el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación que permiten tener una visión global de las alteraciones genéticas que facilitan la diseminación tumoral constituyen un campo prometedor para el manejo del CMTN (Muinao, Deka Boruah, & Pal, 2018).

## 1.2 CÁNCER DE OVARIO

Los ovarios, son dos estructuras con forma ovalada que se encuentran situadas en la parte baja del abdomen, a ambos lados del útero, fijadas por los ligamentos útero-ováricos y ancladas a la propia pared pelviana mediante los infundíbulos pelvianos. Presentan un tamaño de 1x2x3 centímetros en las mujeres en edad fértil, su color es blanco grisáceo y tienen un peso de unos 6 gramos cada uno. Sus dos principales funciones son la producción de óvulos y la producción de estrógenos y progesterona (Peter Leung Peter Leung Eli Adashi, 2003) (Figura 8).

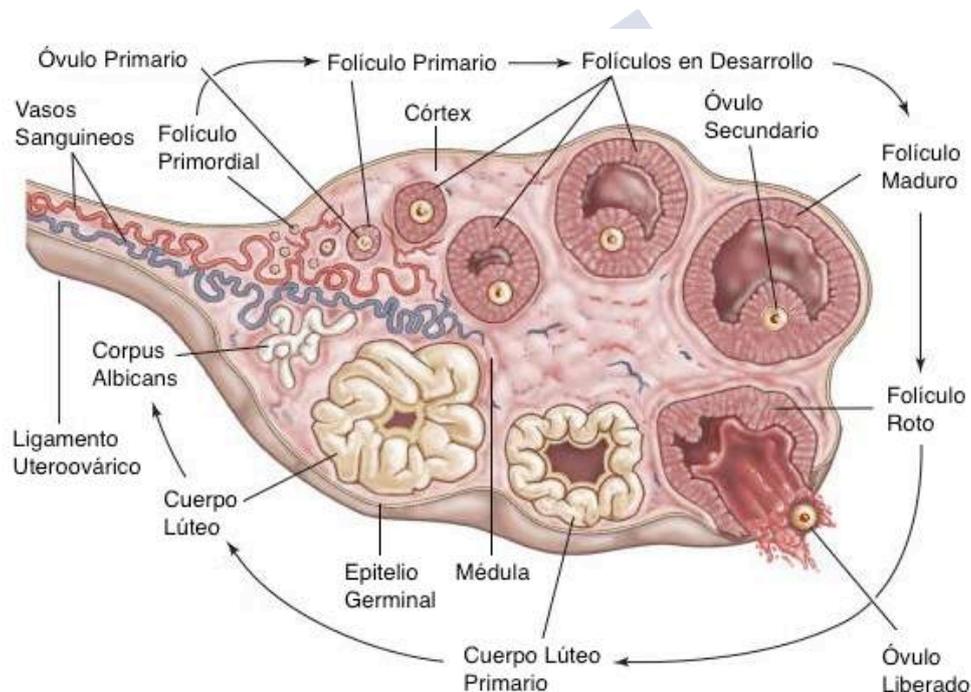


Figura 8: Anatomía del ovario. Adaptado de Enciclopedia Británica 2012. Con autorización de Enciclopedia Británica.

### 1.2.1 Subtipos

El cáncer de ovario se divide en varios subtipos en función del componente del ovario del que derivan (Vinay Kumar, Abul K. Abbas, 2015).

Los **carcinomas epiteliales** derivan del epitelio de superficie que proviene del epitelio celómico o del epitelio endometrial ectópico. Estos carcinomas incluyen el adenocarcinoma seroso, el adenocarcinoma mucinoso, el adenocarcinoma endometriode, el adenocarcinoma de células claras, el carcinoma de células transicionales (Brenner o no Brenner), el carcinoma mixto y el carcinoma indiferenciado.

Los **tumores malignos del estroma** tienen como origen el estroma del ovario, que incluye los cordones sexuales que son los precursores del aparato endocrino del ovario postnatal. Estos tumores incluyen los tumores malignos de células de la granulosa-estroma, los tumores malignos de células de Sertoli-estroma, los tumores de células de Leydig y los tumores mixtos de los cordones sexuales-estroma.

Los **tumores malignos de células germinales** provienen de las células germinales que migran desde el saco vitelino y son pluripotenciales. Dentro de este grupo se incluye el disgerminoma, el carcinoma embrionario, el tumor de Yolk Sac, el teratoma inmaduro, el poliembrioma y los tumores mixtos de células germinales.

Es importante destacar que los tumores epiteliales son los más comunes, representando más del 90-95% del total de los casos, siendo aproximadamente el 70-80% tumores serosos, de los cuales solamente un 25% son diagnosticados en estadios tempranos (Testa, Petrucci, Pasquini, Castelli, & Pelosi, 2018). Los tumores malignos del estroma y los tumores malignos de células germinales representan menos de un 10% del total de la malignidad ovárica (K.G. Manton, Igor Akushevich, 2009).

### **1.2.2 Epidemiología**

El cáncer de ovario, es el sexto tipo de cáncer más común en el mundo y la principal causa de muerte producida por tumores ginecológicos en Estados Unidos y Europa. Según datos de la Agencia

Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, los tumores de ovario representan el 4% de los nuevos diagnósticos de cáncer y son responsables del 4,3% de las muertes causadas por cáncer en mujeres a nivel mundial. Se estima que cada año se diagnostican 239.000 casos mundialmente, siendo diagnosticados la mayor parte en Europa central y del este (Ferlay et al., 2015). Por otra parte, los ratios de incidencia más bajos se encuentran entre las poblaciones asiática y africana (Cortez, Tudrej, Kujawa, & Lisowska, 2018; Testa et al., 2018). Es importante mencionar también que su incidencia media está bajando en las últimas décadas, pasando de 15 nuevos casos diagnosticados por cada 100.000 mujeres en el año 2000 a 11,5 casos en 2014 (Testa et al., 2018). La estima es que aproximadamente el 1,4% de las mujeres serán diagnosticadas de un cáncer de ovario en algún momento de sus vidas.

Es importante comentar que existen ciertos factores que aumentan la posibilidad de padecer un tumor de ovario:

- **Edad.** El riesgo de padecer cáncer de ovario aumenta con la edad, presentándose en la mayoría de los casos en mujeres de más de 63 años (Rooth, 2013).
- **Obesidad.** Las mujeres con índice de masa corporal elevado presentan un mayor riesgo de padecer cáncer de ovario (Crane, Khulpateea, Alberts, Basen-Engquist, & Thomson, 2014).
- **Control de la natalidad.** Las mujeres que han usado anticonceptivos orales presentan un menor riesgo de padecer cáncer de ovario (Crane et al., 2014).
- **Cirugía ginecológica.** La ligadura tubárica y la histerectomía pueden reducir la posibilidad de padecer cáncer de ovario hasta en dos tercios (Rooth, 2013).
- **Medicamentos para la fertilidad.** El uso de Clomifeno por más de un año, puede aumentar el riesgo de padecer tumores

ováricos (Gajjar, Ogden, Mujahid, & Razvi, 2012).

- **Antecedentes personales.** Una mujer que ha tenido cáncer en una mama presenta un riesgo aumentado de presentar un tumor de ovario (Rooth, 2013).
- **Antecedentes familiares.** El riesgo de padecer cáncer de ovario se ve aumentado si tienen algún pariente de primer grado o varios de segundo grado a los que se le ha diagnosticado cáncer de mama, ovario o colorrectal (Gajjar et al., 2012).
- **Predisposición genética:** Principalmente las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Bane et al., 2013).
- **Factores del estilo de vida.** Distintos factores como el peso elevado, la baja actividad física, la mala alimentación y el consumo excesivo de alcohol pueden contribuir al desarrollo de cáncer de ovario (Chaveepojnkamjorn et al., 2017).

Si nos centramos en el carcinoma seroso de alto grado, factores tanto hormonales como reproductivos, se han relacionado con su patogénesis. Básicamente se proponen dos hipótesis: (1) “teoría de la ovulación incesante” que sostienen que un mayor número de ciclos ovulatorios incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de ovario, debido al incremento del riesgo de la aparición de mutaciones somáticas en las células epiteliales del ovario; (2) “teoría de la gonadotropina” que atribuye a esta hormona una actividad a nivel molecular, que estimula la formación de tumores de ovario. Según estas hipótesis la menarquia temprana y la menopausia tardía incrementan el riesgo de padecer cáncer de ovario (Reid, Permuth, & Sellers, 2017).

Por otro lado, como reflejo de la agresividad de este tumor es importante destacar que el número de muertes que causó en 2014 fue de 7,4 por cada 100.000 mujeres a nivel mundial. El subtipo con

mayor mortalidad es el carcinoma seroso de alto grado (Siegel, Miller, & Jemal, 2015). Aunque el porcentaje de supervivencia a 5 años es superior al 90% en pacientes diagnosticadas en estadio temprano, el 80% de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados, bajando la supervivencia a 5 años al 73% en las pacientes con diseminación regional y a un 19% en las pacientes con metástasis a distancia. Por ello, la supervivencia a 5 años de la población general afectada con cáncer de ovario está en torno al 46,5%. En las pacientes que presentan recurrencia resistente a platinos tras la primera línea de tratamiento la supervivencia a cinco años es inferior al 30%. El bajo porcentaje de detección temprana está justificado por la falta de sintomatología evidente y la ausencia de métodos de monitorización o de diagnóstico temprano en mujeres sanas o en poblaciones de alto riesgo (Siegel et al., 2015).

### 1.2.3 Características moleculares

El cáncer de ovario es una patología que presenta una gran heterogeneidad molecular (Figura 9). En los últimos años ha surgido un modelo dual para clasificar patológicamente los tumores en dos grupos, el tipo 1 y el tipo 2 (Kurman & Shih, 2016).

Los tumores de **Tipo 1** (10% del total) tienden a ser de bajo grado y causar poca sintomatología. Dentro de este primer tipo se encuentran los tumores serosos de bajo grado, los endometrioides, los mucinosos, los de células claras y los tumores malignos de Brenner. Este tipo de tumores se caracterizan por la presencia de mutaciones en *RAS*, *BRAF*, *HER2*, *CTNNB1*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *PTEN*, y *ARID1A* y son genéticamente relativamente estables. Estas mutaciones se desarrollan en las primeras etapas de la evolución de la enfermedad y también se observan en tumores con bajo potencial de malignidad y en endometriosis, aunque hoy en día se puede realizar un estudio del desarrollo del tumor que permite diferenciar con claridad entre lesiones precursoras benignas y lesiones malignas (Kurman & Shih, 2016).

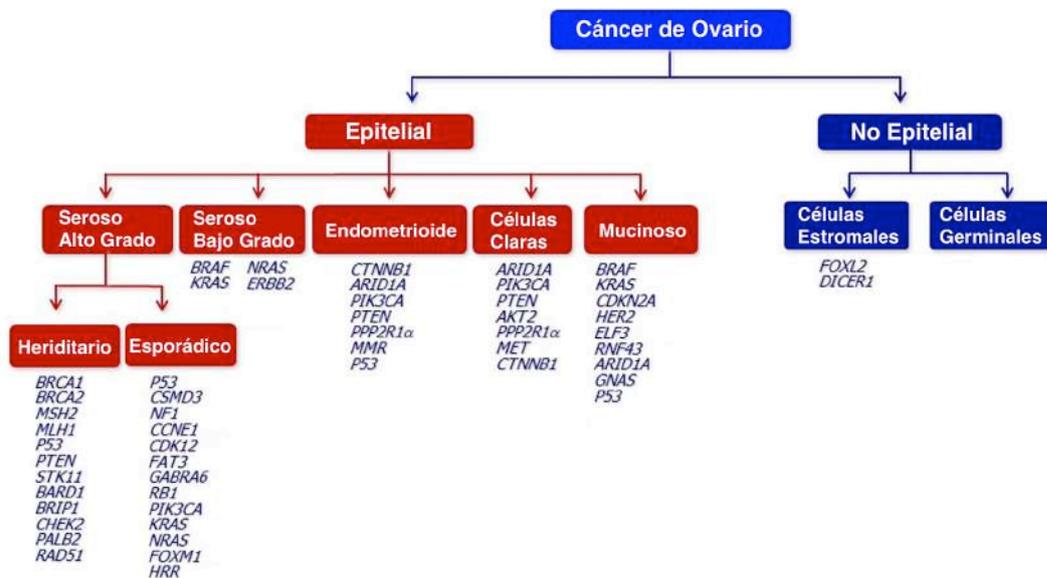


Figura 9: Subtipos de cáncer de ovario y alteraciones moleculares asociadas a cada uno de ellos.

En cuanto a los tumores de **Tipo 2**, que comprenden los tumores serosos de alto grado, los tumores endometrioides de alto grado, los tumores mesodérmicos mixtos y los tumores indiferenciados, es importante destacar que son muy agresivos y de alto grado. Este tipo de tumores no presentan lesiones precursoras claras y están asociados con mucha frecuencia a mutaciones en *P53* (el 97% de los tumores serosos de alto grado portan mutaciones en *P53*), a la inactivación de *BRCA* (50% del total) y a una alta inestabilidad cromosómica. Por otra parte, suelen presentar mutaciones en *RAS*, *RBI*, *PIK3CA* y *FOXM1* (Kurman & Shih, 2016).

#### 1.2.4 Alteraciones moleculares durante el proceso de metástasis

En cuanto al proceso de metástasis, está descrito que puede ocurrir de dos formas diferentes. La forma más común, conocida como **diseminación transcelómica**, se produce a través del fluido intraperitoneal y a través de líquido ascítico, diseminando hacia el peritoneo, los órganos peritoneales y preferencialmente hacia el omento, el cual representa la localización metastásica preferencial en

cáncer de ovario. Está descrito que la adhesión celular y la formación de metástasis se ve favorecida por la expresión de proteínas de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) principalmente MMP-2 y MMP-9, las cuales favorecen en proceso de adhesión celular y la formación de líquido ascítico mediante la expresión de VEGF. A su vez, está también descrito que el incremento en la expresión de ECAD favorece al proceso de adhesión celular. La proteína CXCL12 presente en el líquido ascítico se une a CXCR4 incrementando el potencial migratorio de las células tumorales y a su vez el líquido ascítico estimula la expresión de CD44 que tras su unión al ácido hialurónico facilita la migración y la adhesión celular (Yeung et al., 2015).

La otra forma de diseminación es la **hematógena/linfática**, mediante la cual las células tumorales invaden los vasos sanguíneos o linfáticos, respectivamente, viajan a través de los mismos y finalmente llevan a cabo una extravasación generando metástasis a distancia. Debido a que se sabe que la diseminación transcelómica representa el mecanismo dominante en el proceso de metástasis en ovario, este tipo de diseminación y las CTCs han sido mucho menos estudiadas en cáncer de ovario (Yeung et al., 2015).

McGrail y colaboradores describieron que en ambos tipos de diseminación las células sufren un proceso de EMT mediado por la vía de Rho/ROCK, el cual se considera un paso clave en el proceso de metástasis en cáncer de ovario (McGrail, Kieu, & Dawson, 2014). En este sentido es importante mencionar que tanto TGF- $\beta$ , EGF, HGF y ET-1 inducen EMT en líneas celulares de cáncer de ovario. Asimismo niveles altos de factores que inducen EMT, como TWIST1 y ZEB1 se han asociado con una mayor invasividad y agresividad en líneas tumorales y pacientes con cáncer de ovario (D. Chen et al., 2013; Kajiyama et al., 2006; Vergara et al., 2010).

Además, existen evidencias de la clara relación entre la aparición de un fenotipo mesenquimal en tumores de ovario y la adquisición de mecanismos de quimio-resistencia. Por ejemplo, se ha

descrito la expresión alta de *TWIST*, *SNAIL*, *SLUG* y *VIM* en líneas de cáncer de ovario resistentes a Cisplatino (Davidson et al., 2015; Haslehurst et al., 2012). Concordantemente, en muestras de ascitis de pacientes con cáncer de ovario seroso, la presencia de niveles altos de *VIM* y *ZEB1* se asoció a una peor respuesta a quimioterapia (Beaufort et al., 2014). Éstos y otros resultados de estudios realizados *in vitro* con líneas celulares y en distintas cohortes de pacientes, demuestran el importante papel del proceso de EMT para la progresión de los tumores de ovario.

### 1.2.5 Alternativas terapéuticas

Cuando los clínicos se enfrentan a un caso de cáncer de ovario, la práctica de cirugía y la posterior administración de quimioterapia, sigue siendo la base del tratamiento para este tipo de pacientes (Cortez et al., 2018).

**Cirugía:** Como hemos comentado, la base del tratamiento del cáncer de ovario sigue siendo la cirugía (citorreducción primaria óptima), seguida, según se requiera, de quimioterapia adyuvante basada en platinos y taxanos (“NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer.,” 1995). La citorreducción primaria, es el principal tipo de cirugía que se lleva a cabo en este tipo de pacientes, pero existen otras modalidades que se pueden llevar a cabo durante las distintas etapas del curso de la enfermedad como son la cirugía citorreductora de intervalo, la cirugía de segunda mirada, la cirugía citorreductora secundaria y la cirugía paliativa (Caprotti et al., 2006; Eisenkop, Friedman, & Spirtos, 2000; Mangili et al., 2005; Vergote, van Gorp, Amant, Neven, & Berteloot, 2005).

**Quimioterapia:** La mejora de las tasas de supervivencia en pacientes con tumores de ovario observadas se debe principalmente, a la introducción en las décadas de los ochenta y noventa de la quimioterapia basada en platinos y en taxanos.

-Neoadyuvancia: La quimioterapia neoadyuvante basada en platinos es la que se utiliza como primera opción de tratamiento, previo a la cirugía. Cuando no se puede practicar una citorreducción primaria óptima (70% de cánceres avanzados), la quimioterapia neoadyuvante permite conseguir la realización de la cirugía óptima en una proporción elevada de mujeres que en un principio se desestiman para esta la intervención (Cortez et al., 2018; Hegazy et al., 2005). Es importante destacar que dos ensayos clínicos aleatorios realizados en Europa publicados en 2003, demostraron que la quimioterapia neoadyuvante basada en platinos, se encuentra asociada a una mayor supervivencia total en aquellas pacientes de riesgo elevado y con una etapa temprana de la enfermedad (Trimbos et al., 2003; Young, 2003).

-Adyuvancia: El tratamiento clásico en primera línea de cáncer de ovario consiste en la administración de seis ciclos de quimioterapia basada en platinos y taxanos (Bookman, 2005; du Bois et al., 2005). No obstante, la quimioterapia estándar con platinos y taxanos sólo cura alrededor de 25% de los casos de carcinoma ovárico avanzado. Así diversos estudios en marcha tratan de averiguar la eficacia de secuencias de administración diferentes (administración secuencial, semanal, mantenimiento) o de la suma de un tercer fármaco (en formas de dobletes secuenciales o tripletes) al esquema carboplatino y paclitaxel. Hasta la fecha no se tiene suficiente información para recomendar alguno de los nuevos regímenes con dos o tres fármacos, por encima de la combinación de carboplatino y paclitaxel como tratamiento de primera línea (Poveda, 2005).

-Quimioterapia intraperitoneal: La vía de administración intraperitoneal de quimioterapia consiste en introducir fármacos citotóxicos mediante un catéter insertado en la cavidad peritoneal, con el fin de minimizar los efectos secundarios sistémicos, pudiendo así aumentar la dosis del citotóxico en contacto con el tumor. Este tipo de administración ha proporcionado datos de mejora de supervivencia (Armstrong et al., 2006) aunque su eficacia debe ser confirmada de forma inequívoca en ensayos clínicos en fase III (Cortez et al., 2018).

**Terapias dirigidas e inmunoterapia:** Fármacos dirigidos contra varios objetivos moleculares, han sido desarrollados y están siendo objeto de estudio para el tratamiento de este tipo de pacientes con la intención de mejorar su supervivencia (Duncan et al., 2008; Leffers et al., 2009; Mendelsohn, 2002; S. Yu et al., 2008). De entre ellos cabe destacar, de forma particular, la efectividad de los Inhibidores de PARP (Cortez et al., 2018; Leffers et al., 2009).

Las proteínas PARP1 y PARP2 juegan un papel crucial en la reparación de las roturas en el ADN de cadena simple. En tumores con *BRCA* mutado el tratamiento con este tipo de fármacos lleva a un daño masivo del ADN y la consiguiente muerte celular (Yap, Sandhu, Carden, & de Bono, 2018). Tanto el olaparib, como el niraparib, se han aceptado recientemente como estándar de tratamiento en pacientes con cáncer de ovario recurrente *BRCA* mutado. Por otra parte, se ha visto que el olaparib aumenta de forma significativa la SLP en pacientes con cáncer de ovario recurrente con sensibilidad a platinos, independientemente del estado mutacional de *BRCA*. El niraparib mostró los mismos resultados, lo cual sugiere que aunque la eficacia de ambos es mayor en pacientes *BRCA* mutados, también puede beneficiar a otro tipo de pacientes (Papa, Caruso, Strudel, Tomao, & Tomao, 2016).

Por otro lado, la activación de la respuesta inmune mediante el empleo de **anticuerpos anti-PD1** (pembrolizumab o nivolumab) o **anti-PD-L1** (atezolizumab y durvalumab) no ha demostrado mucha actividad en cáncer de ovario ya que solo alcanzan respuestas en torno al 10% y en la mayoría de los casos de corta duración (Iwai, Hamanishi, Chamoto, & Honjo, 2017). Desafortunadamente, el uso de inhibidores de EGFR (erlotinib, cetuximab y lapatinib) tampoco ha mostrado buenos resultados en los ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes con cáncer de ovario (Cortez et al., 2018). Sin embargo, si se han obtenido beneficios clínicos utilizando anti-angiogénicos como el bevacizumab. Este fármaco es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se une a VEGFR para bloquear su actividad, produciendo la normalización de la vasculatura tumoral y

reduciendo la presión intersticial del tumor, mejorando de esta forma, la efectividad de la terapia convencional. Sin embargo, el elevado precio del fármaco y la falta de marcadores predictivos de respuesta al mismo, dificultan su implementación en la mayoría de sistemas nacionales de salud (Cortez et al., 2018). También cabe mencionar que se encuentran en marcha ensayos clínicos para testar la acción de inhibidores del receptor de VEGF como, el ceridanib, el pazopanib y el nintedanib y de un inhibidor de angiopoyetina denominado trebananib.

Por último, es importante comentar que se han identificado nuevas dianas para el desarrollo de fármacos tales como CTLA-4, P53, la señalización del ácido lisofosfatídico, y las proteínas de la familia BCL-2 (Duncan et al., 2008), pero aún no se utiliza en clínica ninguna terapia frente a estas dianas.

### **1.2.6 Retos para el manejo clínico del cáncer de ovario**

Debido a que la gran mayoría de las pacientes con este tipo de tumores son diagnosticadas en estadios avanzados, el cáncer de ovario sigue siendo el tumor ginecológico que más muertes causa. Por ello, es de gran importancia el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y detección temprana para este tipo de tumores. La ultrasonografía transvaginal y el CA-125 son los métodos más comunes para la detección de cáncer de ovario, pero a pesar de esto siguen sin existir marcadores con una alta sensibilidad para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Muinao et al., 2018).

El CA-125 es el marcador serológico más estudiado para la detección de tumores de ovario de origen epitelial. Una concentración serológica de CA-125 superior a 35 U/ml es indicativa de una potencial patología. Su especificidad y sensibilidad rondan el 90% y el 60% respectivamente en estadios tempranos, mientras que, en estadios avanzados, la sensibilidad alcanza el 80-90% (Rein et al., 2011). La principal limitación de este marcador es su ausencia en un 20% de los tumores de ovario y por otra parte su elevación en otras

condiciones benignas como la peritonitis, fases del ciclo menstrual y el embarazo (Buamah, 2000). Por otra parte el marcador HE4 ha recibido la autorización de la FDA para la monitorización de la progresión de la enfermedad (Montagnana et al., 2011). Este marcador presenta la mayor sensibilidad para la detección de estadios I, con un 46% de sensibilidad y un 95% de especificidad. A pesar de esto los niveles séricos de HE4 no son susceptibles de ser utilizados para el diagnóstico del cáncer de ovario (Van Gorp et al., 2011).

Un estudio reciente ha descrito que el uso del panel compuesto por CA-125, HE4, ECAD e IL-6 presenta un mayor potencial para diferenciar entre pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano y controles sanos (AUC = 0,961) que CA125 (AUC = 0,851), que HE4 (AUC = 0,870) e, incluso, que su combinación CA125/HE4 (AUC = 0,922) (Han et al., 2018). Otro estudio reciente ha demostrado que el marcador B7-H4, que interviene en la regulación negativa de las células T, en combinación con CA-125 presenta una sensibilidad del 65% y una especificidad del 97% para el diagnóstico de pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano (Simon et al., 2006). Por otra parte, la combinación de APOA1, CA-125 y  $\beta$ 2M alcanza una sensibilidad del 94% y una especificidad del 98% para identificar pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano (Clarke et al., 2011).

Se han descrito otras glicoproteínas como potenciales marcadores de diagnóstico para el cáncer de ovario. Por ejemplo, la osteopontina, una glicoproteína constituyente de la matriz extracelular, se identificó mediante técnicas de *microarrays* de ADNc, como biomarcador para la detección temprana de cáncer de ovario (J.-H. Kim et al., 2002). Esta proteína, además de discriminar tumores malignos de benignos (J.-H. Kim et al., 2002), mostró una especificidad del 80,4% con una sensibilidad diagnóstica del 80,4% en estadios I y II (J.-H. Kim et al., 2002). Pero a pesar de los datos prometedores, su potencial rol como marcador pronóstico sigue siendo objeto de estudio (Muinao et al., 2018). Por otro lado, el cáncer de ovario presenta sobre-expresión de mesotelina en un 60% de los

casos. Se sabe que las células tumorales con altos niveles de esta glicoproteína participan en el proceso de metástasis, ya que junto con el CA-125 favorecen la adhesión celular al mesotelio peritoneal promoviendo la formación de metástasis (M.-C. Chang et al., 2012). Así, niveles elevados de este marcador se asociaron a una peor SG en pacientes tras cirugía o en estadios avanzados (M.-C. Chang et al., 2012).

También encontramos miARNs que se alteran en tumores de ovario y que tienen interés como marcadores para el diagnóstico. Es el caso de miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214 (H. Zheng et al., 2013). Asimismo, la expresión del miR-455 se encontró significativamente disminuida en tejidos y en líneas celulares de cáncer de ovario. Esta expresión correlaciona con el tamaño tumoral, el estadio y la presencia de metástasis ganglionares en pacientes con cáncer de ovario. Por otra parte, la restauración de la expresión de miR-455, inhibe la proliferación y la invasión celular *in vitro*. Estos datos evidencian la función supresora de tumores de miR-455, llevada a cabo mediante la regulación de NOTCH1, por lo que además representa una interesante diana terapéutica para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario (Lixia Xu, Li, Su, Lu, & Liu, 2017).

Además de marcadores para el diagnóstico temprano otra de las necesidades clínicas para su mejor manejo es la identificación de nuevos marcadores pronóstico que predigan que pacientes van a tener una peor evolución. Hay varias moléculas que se han descrito como potenciales marcadores pronóstico. Por ejemplo, la KLK4 se encuentra relacionada con la progresión del cáncer de ovario, principalmente en estadios avanzados (Dong et al., 2001). Estudios bioinformáticos recientes han revelado el potencial valor como biomarcador pronóstico de otros miembros de la familia de las calicreínas, KLK6 y KLK7 en estadios tempranos y carcinomas de ovario de bajo índice de malignidad (Tamir et al., 2014). Por otro lado, la altas expresión de FOLR1 y ALDH1 en carcinomas del ovario

seroso se ha asociado a un peor pronóstico (M.-C. Chang et al., 2012; S. Liu et al., 2013).

Asimismo, la expresión de IBP4 se encuentra aumentada en pacientes con cáncer de ovario y se ha correlacionado con el estadio tumoral, el grado histológico, la carcinomatosis peritoneal, las metástasis ganglionares y la posibilidad de recurrencia. Por otra parte, su alta expresión esta asociada a peores tasas de SLP y SG. Estos resultados demuestran la utilidad de IBP4 como marcador pronóstico (Y. Xu, Hou, Liu, & Lou, 2018). Lo mismo ocurre con el factor de transcripción FOXA1, que se encuentra aumentado en pacientes con cáncer de ovario y su expresión correlaciona con el estadio, el grado de diferenciación tumoral y con la supervivencia de éstos (K. Wang et al., 2018).

Está descrito también que la expresión del ARN largo no-codificante Lnc-OC1 se encuentra aumentada en pacientes con cáncer de ovario, asociándose a un peor pronóstico. El silenciamiento de Lnc-OC1 inhibe la proliferación celular, la formación de colonias, la invasión, la migración *in vitro* y la capacidad tumorigénica *in vivo*. Estos datos demuestran la utilidad de Lnc-OC1 como marcador pronóstico y sugieren su posible uso como diana terapéutica en pacientes con cáncer de ovario (Tao, Tian, Lu, & Zhang, 2018).

Es importante destacar también que se está avanzando mucho en la identificación de nuevas rutas y moléculas a las que dirigir la terapia, pero a nivel clínico, tal y como se comentó anteriormente, los tratamientos dirigidos aplicados en cáncer de ovario son pocos. Comentamos a continuación algunos de los fármacos y vías de estudio más prometedores.

El calcitriol es un metabolito activo de la Vitamina D que actúa como una potente hormona esteroidea. Se ha observado, en modelos *in vivo* murinos, que la administración de calcitriol reduce el crecimiento tumoral en estos modelos de cáncer de ovario. Por otra parte, el tratamiento con calcitriol produce un reducción de la

población de CMC por lo que tiene gran interés para bloquear la formación de metástasis (Srivastava et al., 2018). Por otro lado, la isoliquiritigenina reduce la viabilidad, la proliferación y la invasión e induce apoptosis en las líneas celulares de ovario SKOV3 y OVCAR3 a través de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Estos datos sugieren que el tratamiento con isoliquiritigenina puede ser efectivo en pacientes con cáncer de ovario (N. Li, Yang, Deng, & Sun, 2018).

El anticuerpo monoclonal IgG1-2448, dirigido contra un epítipo específico de ANXA2, presenta potencial para intervenir en la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo *in vitro* e *in vivo* y también en la toxicidad mediada por anticuerpo (cuando esta conjugada con un agente citotóxico) en cáncer de ovario. Estos datos sugieren que ANXA2 puede ser una potencial diana terapéutica y el anticuerpo 2448 presenta interés para el desarrollo de terapias contra este tipo de tumores (Cua et al., 2018).

Por otro lado, tal y como se comentó anteriormente, se sabe que durante el proceso de metástasis las células tumorales de ovario sufren un proceso de EMT mediado por la vía de Rho/ROCK, el cual se considera un paso clave en el proceso de metástasis en cáncer de ovario, considerándose ROCK una interesante diana terapéutica para el tratamiento de pacientes con este tipo de tumores (McGrail et al., 2014). Asimismo, la alta expresión de AKT2, induce migración e invasión celular *in vitro*, así como metástasis pulmonares *in vivo* a través de la expresión de STAT3 y la activación de NF-KB mediada por PK2M. El silenciamiento de AKT2 bloquea dichos efectos, por lo que la terapia dirigida contra AKT2 puede ser también una potencial estrategia terapéutica en cáncer de ovario (B. Zheng, Geng, Zeng, Liu, & Huang, 2018)

Se ha descrito a su vez, que SREBP2 se encuentra elevado en las células de la línea celular A2780 resistentes después de tratamiento con cisplatino. Además, el uso del ARN de interferencia para bloquear la expresión de SREBP2 mostró reducción de la viabilidad de estas células tras el tratamiento, evidenciando su interés como marcador de

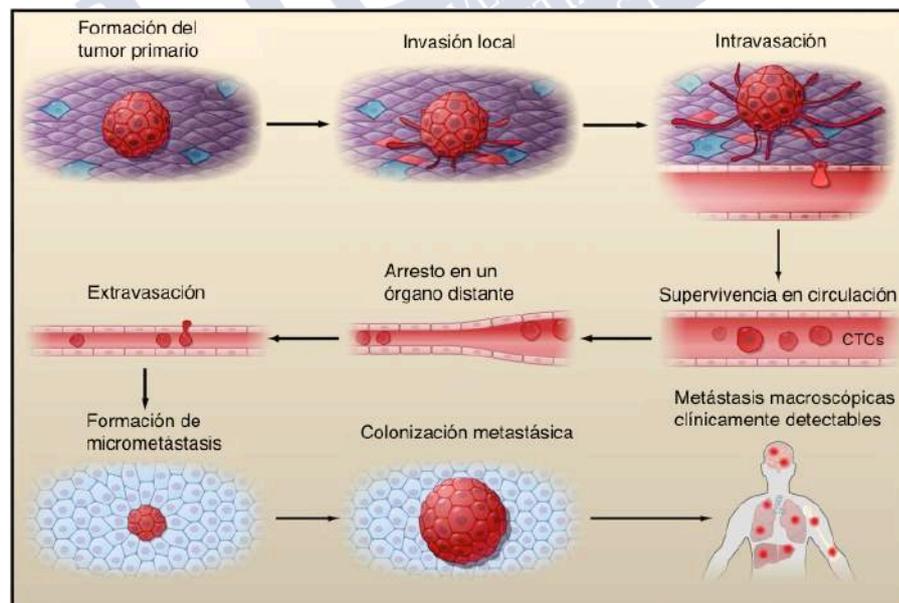
respuesta y el valor de su bloqueo terapéutico (L. Zheng, Li, Lu, Jiang, & Yang, 2018).

Es importante comentar también el reto que supone la caracterización de las CMC en tumores de ovario. A pesar de que la presencia de estas células está descrita desde los años 90, el fenotipo de las mismas no está completamente definido (Muinao et al., 2018) aunque la evidencia de que estas células dirigen la recurrencia de la enfermedad, la metástasis y la resistencia a terapia es cada vez más clara (Vaz, Ponnusamy, & Batra, 2013). El estudio de marcadores conocidos como CD24, CD44, CD117 o SOX2 y la identificación de nuevos marcadores asociados a las CMC será, sin duda, muy importante en el desarrollo de terapias dirigidas contra este tipo de tumores en un futuro próximo (Muinao et al., 2018).

Finalmente, es necesario profundizar en el estudio de la combinación de terapias ya que, por ejemplo, en algunos casos una vía de escape paralela que se activa durante un tratamiento monoterápico puede ser bloqueada mediante una terapia combinada. Por último, es de gran importancia la estratificación molecular de los pacientes para de este modo poder administrarles el tratamiento del que puedan obtener un mayor beneficio (Vetter & Hays, 2018).

### 1.3 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Más del 90% de las muertes relacionadas con cáncer son debidas al desarrollo de metástasis (Talmadge & Fidler, 2010). A pesar de ello, históricamente la investigación en cáncer se ha basado en el estudio de lesiones primarias. Esto es principalmente debido a la mayor disponibilidad de material perteneciente a tumores primarios en comparación con el material procedente de lesiones metastásicas y también a la mayor dificultad para el estudio de la diseminación metastásica en modelos *in vivo* (Seyfried & Huysentruyt, 2013). Por este motivo nuestro conocimiento sobre las características y vulnerabilidades de las células metastásicas es bastante limitado, dificultando la identificación y desarrollo de agentes para tratar de controlar el proceso de metástasis. Dicho proceso, relativamente ineficiente, comprende varias etapas previamente mencionadas al hablar de la diseminación de los tumores de mama y ovario, como la intravasación de la células tumorales, su supervivencia en circulación como CTCs y su posterior extravasación y anidamiento a distancia (Nguyen, Bos, & Massagué, 2009) (Figura10, Tabla2).



**Figura 10: Proceso de diseminación metastásica.** En el esquema se observa como las células intravascan tras la invasión local para, posteriormente, tras sobrevivir en

circulación, extravasar en órganos distantes generando nuevas localizaciones metastásicas. Adaptado de (Valastyan et al. 2011). Con autorización de Cell Press.

Durante el proceso tumorigénico, una subpoblación tumoral puede adquirir un fenotipo migratorio e invasivo, que le proporciona capacidad de intravasarse a la circulación sanguínea y/o linfática. Este proceso de intravasación se ve favorecido por las propiedades de los vasos sanguíneos asociados al tumor, que se forman mediante el proceso de neoangiogénesis. Algunas de estas propiedades, diferenciales con respecto a la vasculatura normal, se ven influenciadas en parte, por la acción de VEGF. Principalmente podemos hablar de una vasculatura tortuosa, con una interacción muy débil entre células endoteliales adyacentes y la ausencia de una cobertura de pericitos, características que favorecen la intravasación (Carmeliet & Jain, 2011).

En circulación estas células se ven sometidas a un alto estrés mecánico, a señales de *anoikis* y al ataque de las células inmunes en el sistema circulatorio. A pesar de ello, algunas de ellas son capaces de sobrevivir y alcanzar órganos distantes en un estado de viabilidad y de este modo, formar lesiones metastásicas. Un gran número de estudios, tanto prospectivos como retrospectivos, han demostrado la asociación entre niveles elevados de CTCs y el mal pronóstico en pacientes con distintos tipos de cáncer, así como su valor para la monitorización temprana de la respuesta a terapia (Castro-Giner, Scheidmann, & Aceto, 2018; Pantel & Speicher, 2016). Por otra parte, la caracterización de las CTCs constituye una herramienta de incalculable valor para la identificación de alteraciones moleculares implicadas en la formación de las lesiones metastásicas (Fehm et al., 2009). Además, la expansión *in vitro/vivo* de CTCs permite llevar a cabo ensayos funcionales, que facilitan su caracterización fenotípica (proliferación, invasividad, etc) y también el estudio de su respuesta frente a determinados fármacos (M. Yu et al., 2014), constituyendo un modelo pre-clínico único.

**Tabla 2: Principales características del proceso de diseminación metastásica.**

PROCESO	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS
Intravasación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matriz celular y membrana basal desestructurada en la zona tumoral.</li> <li>• Vasculatura tortuosa y en continua remodelación.</li> <li>• Motilidad, invasividad. Participación activa de la célula tumoral mediante el proceso de EMT.</li> <li>• Químico-gradientes de EGF o TGFβ.</li> </ul>
Circulación Hematógena	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evasión de la anoikis.</li> <li>• Formación de agregados celulares.</li> <li>• Formación de agregados plaquetarios protectores.</li> <li>• Ralentización de ciertos procesos fisiológicos.</li> <li>• Pérdida o reducción del citoplasma.</li> <li>• Evasión del sistema inmune. Expresión de PDL-1.</li> </ul>
Arresto-Extravasación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso inverso a la intravasación. Más complicado.</li> <li>• Retención física en capilares sanguíneos.</li> <li>• Retención mediada por moléculas de adhesión.</li> </ul>
Anidamiento a Distancia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperación de características previas a la diseminación, mediante el proceso de MET.</li> <li>• El 80% de las células que comienzan el proceso de extravasación son capaces de anidar.</li> <li>• Solamente un 3% de ellas se convierten en micrometástasis.</li> <li>• Solamente un 0,02% de ellas progresan a lesiones macroscópicas.</li> </ul>

### 1.3.1 Técnicas de aislamiento y caracterización de CTCs

La presencia de células tumorales diseminadas en sangre fue ya descrita en 1869 por el médico Thomas Ashworth en pacientes con cáncer de mama (Haber & Velculescu, 2014), aunque hasta finales del siglo XX no se disponía de tecnología para su estudio. Actualmente, el estudio de las CTCs encuentra su limitación principal en el bajo número de este tipo de células en circulación, que dificulta su aislamiento entre el resto de los componentes de la sangre. Se estima que hay una CTC por cada  $10^6$ - $10^8$  células sanguíneas en pacientes metastásicos (Coumans, Ligthart, Uhr, & Terstappen, 2012; Joosse, Gorges, & Pantel, 2015). Debido a esta limitación es necesario su enriquecimiento para hacer posible su posterior estudio. Existen diferentes tecnologías para el aislamiento de CTCs basadas en distintas propiedades de las mismas. Algunas de estas tecnologías están basadas en **propiedades físicas** como el tamaño, densidad, deformabilidad o carga dieléctrica. Estos métodos incluyen estrategias de centrifugación en gradientes o de filtración. Otras se basan en **propiedades biológicas** como la expresión específica de proteínas de membrana celular, como EpCAM, o la viabilidad e invasividad de las CTCs, que las diferencia de las células sanguíneas (Gabriel, Calleja, Chalopin, Ory, & Heymann, 2016; Joosse et al., 2015) (Figura 11).

Los principales métodos de aislamiento, basados en propiedades físicas, son: los sistemas de filtración como MetaCell<sup>®</sup> o ISET<sup>®</sup>; la centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll<sup>®</sup> o similares y los sistemas de microfluídica como el Parsortix<sup>®</sup> o el DFFchip<sup>®</sup>. Todos ellos utilizan el mayor tamaño de las CTCs frente a las células sanguíneas para aislarlas. Existen otras tecnologías, pertenecientes a diferentes casas comerciales, con pequeñas variaciones, pero en esencia muy similares a las ya mencionadas (Joosse et al., 2015).

Los principales métodos de aislamiento de CTCs basados en propiedades biológicas son: el CellSearch<sup>®</sup>, que se basa en la separación mediante ferrofluidos unidos a anticuerpos anti-EpCAM; Dynabeads<sup>®</sup> o AdnaTest<sup>®</sup> que se basan en el uso de partículas inmunomagnéticas unidas a anticuerpos anti-EpCAM; CellCollector<sup>™</sup> que se basa en el uso de un filamento recubierto con anticuerpos anti-EpCAM y que se introduce en una vía tomada al paciente para capturar las CTCs *in vivo*; CTC-Chip<sup>®</sup> o HB-Chip<sup>®</sup> basados en el uso de canales de microfluídica recubiertos con anticuerpos anti-EpCAM; Isoflux<sup>®</sup> basado en el uso de un canal imantado y partículas inmunomagnéticas unidas a anticuerpos anti-EpCAM; MACS<sup>®</sup> o EasySep<sup>®</sup> basado en depleción negativa de células sanguíneas y VitaAssay<sup>™</sup>, que se basa en diferencias en capacidad invasiva de las células aisladas (Joosse et al., 2015).

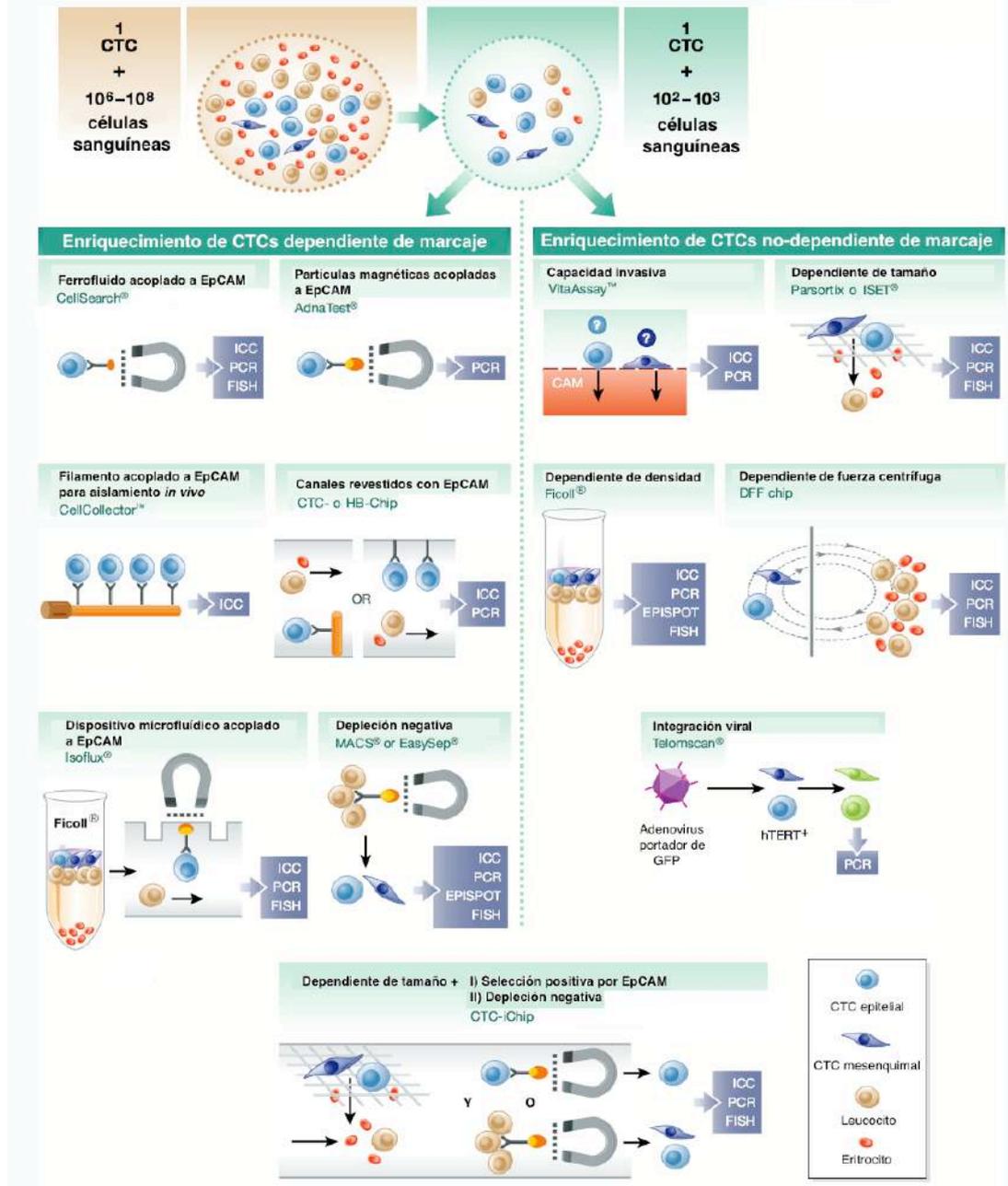
También se pueden combinar las dos estrategias, tal y como sucede con el CTC-iChip<sup>®</sup> que enriquece las células por tamaño y posteriormente lleva a cabo un segundo enriquecimiento mediante selección EpCAM positiva o la depleción negativa de células sanguíneas (Joosse et al., 2015).

Es importante destacar que la tecnología CellSearch<sup>®</sup> (Menarini-Silicon Biosystems) es la única aprobada por la Food & Drug Administration (FDA) para el conteo de CTCs con objetivos clínicos en tumores metastásicos de mama, próstata y colon. Este sistema permite enumerar las CTCs EpCAM positivas combinando

una estrategia de inmunoaislamiento e inmudetección. Para el aislamiento utiliza partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-EpCAM. Posteriormente el sistema lleva a cabo una inmunofluorescencia en las células aisladas, utilizando anticuerpos frente a un panel de citoqueratinas epiteliales (CK8, CK18 y CK19), CD45 (marcador de células sanguíneas) para descartar el aislamiento inespecífico y DAPI para identificar el núcleo celular (L. Wang et al., 2016). Una de las limitaciones de esta tecnología radica en la utilización única de marcadores epiteliales para el aislamiento y la identificación de las CTCs. Es importante resaltar que las CTCs son heterogéneas en cuanto a la expresión de EpCAM, ya que durante el proceso de EMT pueden perder la expresión de este marcador epitelial, evidenciando la limitación de este marcador como única diana para su inmunoaislamiento (Grover, Cummins, Price, Roberts-Thomson, & Hardingham, 2014).

Una vez la muestra ha sido enriquecida, contamos con diferentes metodologías para el estudio y caracterización de las CTCs. Entre las que se encuentran principalmente técnicas de análisis de ADN y ARN basadas en PCR, hibridación y secuenciación y ensayos funcionales con el fin de realizar un análisis fenotípico de las CTCs (Y. Song et al., 2017). En este sentido es importante comentar que en los últimos años se han desarrollado tecnologías como DEPArray<sup>®</sup> (Menarini-Silicon Biosystems) o el VyCAP, destinadas a la obtención de células individualizadas permitiendo una caracterización célula a célula para, de este modo, tener una visión más precisa de la heterogeneidad tumoral (Mesquita et al., 2017; Peeters et al., 2013). Como ejemplo, podemos mencionar un estudio de 2017 en el que se ha llevado a cabo el aislamiento de CTCs en cáncer de mama asociadas a metástasis cerebrales mediante el uso de citometría de flujo la tecnología DEPArray<sup>™</sup> y su caracterización mediante secuenciación de genoma completo (Boral et al., 2017).

## TECNOLOGÍAS PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE CTCs



**Figura 11:** Esquema de los principales métodos de aislamiento de CTCs, dependientes e independientes de antígeno de superficie. Adaptado de (Joosse et al. 2015). Con autorización de EMBO press.

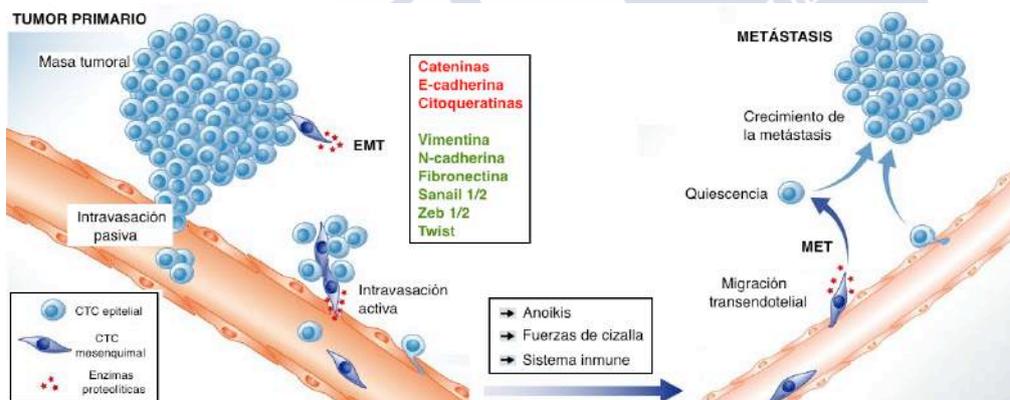
En cuanto a su estudio funcional y también molecular, la generación de cultivos *in vitro* de CTCs es muy importante para poder contar con una mayor cantidad de células para analizar. A pesar de su gran interés, el cultivo de CTCs ha demostrado ser muy poco eficiente ya que requiere del uso de muestras de pacientes con una gran carga tumoral y se necesita una gran eficiencia de aislamiento para obtener un número suficiente que permita establecer el cultivo. Por otra parte, está la escasa viabilidad de las CTCs tras su aislamiento, relacionada entre otros motivos, al estado quiescente al que pasan las mismas cuando se encuentran en circulación. Debido a esto, solamente existen unas pocas evidencias de cultivos establecidos a partir de CTCs (Pantel, Klaus; Alix-panabières, 2015; M. Yu et al., 2014; L. Zhang et al., 2013). Asimismo, cabe mencionar que también se han conseguido establecer explantes derivados de CTCs (CDx) en modelos animales (Hodgkinson et al., 2014; Pereira-Veiga et al., 2018).

### **1.3.2 Transición epitelio mesénquima y CTCs**

La diseminación tumoral hematogena/linfática puede ocurrir de dos formas, de una forma pasiva y de una forma activa. Las células que intravasan de forma pasiva, mediante el crecimiento tumoral expansivo, mantienen con frecuencia la expresión de sus marcadores epiteliales como ECAD, EpCAM o CKs y presentan menor agresividad. Por otra parte, las células que intravasan de forma activa adquieren un fenotipo mesenquimal y de célula madre presentando una mayor agresividad y una mayor capacidad migratoria, invasiva y de autorrenovación. Esto ocurre mediante el proceso de EMT. Mediante este proceso, las células epiteliales pierden su polaridad, expresan marcadores mesenquimales y de célula madre, pierden los contactos célula-célula, sufren una remodelación del citoesqueleto y presentan de este modo un fenotipo migratorio que favorece a la progresión tumoral (Barriere et al., 2014; Polyak & Weinberg, 2009) (Figura 12).

Se ha descrito en CTCs la expresión combinada de marcadores mesenquimales, de célula madre y epiteliales, evidenciando un

fenotipo mixto o intermedio. Esta expresión de marcadores mesenquimales y de célula madre en las CTC favorece ciertos procesos clave para la diseminación tumores como son la intravasación y la extravasación, la supervivencia en el torrente sanguíneo y la adquisición de resistencia frente a diversos agentes antitumorales. En CTCs de cáncer de endometrio, por ejemplo, se ha descrito la expresión conjunta del marcador epitelial *EPCAM* junto con la expresión de los marcadores de EMT *ETV5*, *NOTCH1*, *SNAIL1*, *TGFβ*, *ZEB1* y *ZEB2* y los marcadores asociados a características de célula madre *ALDH* y *CD44* (Alonso-alconada et al., 2014). Por otra parte, también se ha observado la expresión de marcadores asociados a EMT como *TIMP1* o *TGFβ* en la población de CTCs EpCAM positiva de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (Barbazán et al., 2012; Bonnomet et al., 2010; Kölbl, Jeschke, & Andergassen, 2016).



**Figura 12:** Esquema del proceso de diseminación hematogena tumoral y los principales marcadores implicados en el proceso de EMT. En rojo se muestran los marcadores cuya expresión baja durante el proceso y en verde aquellos cuya expresión se ve aumentada durante el mismo. Adaptado de (Joosse et al. 2015). Con autorización de EMBO press.

### 1.3.3 CTCs en tumores de mama triple negativo

Está descrito que los niveles de CTCs en pacientes con CMTN se encuentran correlacionados con el estadio tumoral de la

clasificación TNM y con la presencia de metástasis ganglionares. La monitorización dinámica de dichos niveles, tanto previos como posteriores a cirugía y la administración de terapia, pueden ser un parámetro a tener en cuenta debido a su alto valor para evaluar el pronóstico de las pacientes (Y. Zhang, Lv, Niu, Su, & Feng, 2017). En un meta-análisis llevado a cabo por Lu y colaboradores se evidenció que la detección de CTCs en sangre era un factor predictivo de mal pronóstico en pacientes con CMTN, independientemente de que las mismas sean detectadas en estadios tempranos o metastásicos. En este estudio, remarcaron la importancia de establecer métodos estándar universalmente aceptados para la detección de CTCs con el fin de poder monitorizar sus niveles y, de este modo, guiar el manejo clínico de este tipo de pacientes (Lu et al., 2016). Por otra parte, en un estudio llevado a cabo dentro del ensayo clínico Geparquattro, Riethdorf y colaboradores demostraron que la positividad para CTCs en pacientes con CMTN analizada mediante CellSearch<sup>®</sup> se asociaba a una reducción tanto en SLP como en SG (Riethdorf et al., 2017). Por otra parte, dentro del ensayo clínico JO21095, Iwata y colaboradores describieron que las pacientes con CMTN metastásico con positividad para CTCs analizadas mediante CellSearch<sup>®</sup> presentaban un significativo peor pronóstico clínico que las pacientes en las que no se detectaron CTCs (Iwata et al., 2017).

Para caracterizar mejor la relevancia de P53 en el proceso de metástasis Powell y colaboradores desarrollaron un modelo murino inyectando líneas celulares derivadas de tumores de pacientes con CMTN y sus correspondientes líneas con deficiencia en P53. En este modelo observaron que el número de CTCs correlacionaba con el volumen tumoral y con la presencia de metástasis pulmonares. Por otra parte, el estado de P53 no presentó influencia sobre el grado de liberación de CTCs ni sobre la aparición de metástasis ganglionares o pulmonares. Sin embargo, sí observaron que las CTCs liberadas por los tumores generados a partir de las líneas con deficiencia en P53 producían lesiones metastásicas con un mayor ratio de proliferación (Powell et al., 2016).

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo mediante CellSearch<sup>®</sup>, Jansson y colaboradores describieron la presencia de agrupaciones o *clusters* de CTCs de forma más frecuente en pacientes con CMTN en comparación con las pacientes con receptores de hormonales positivos. La aparición de estos *clusters* estaría en consonancia con la mayor agresividad de los tumores TN ya que en distintos estudios se ha demostrado que la diseminación colectiva es más eficiente que la individual (Jansson, Bendahl, Larsson, Aaltonen, & Rydén, 2016).

Además del valor pronóstico de la monitorización de CTCs en pacientes con CMTN, recientes trabajos se han centrado en su caracterización molecular. Uno de estos estudios se centró en el análisis de expresión de cinco marcadores: CKs (8, 18 y 19), ER, PR, EGFR y HER2. Dentro de las poblaciones analizadas, la más frecuente fue la formada por las CTCs que expresaban conjuntamente CKs y EGFR. Esta población representó el 40-50% de las CTCs estudiadas, predominando claramente entre las demás poblaciones, tanto en un análisis previo a terapia como en un análisis posterior. Esta observación concuerda con la ya descrita alta expresión de EGFR en tumores primarios TN y sugiere un posible beneficio del uso de terapias anti-EGFR en este tipo de pacientes (Agelaki et al., 2017; Siziopikou & Cobleigh, 2007). Otro dato interesante es la mayor tasa de recaída que presentaron las pacientes con CTCs positivas para CKs y negativas para ER (Agelaki et al., 2017). Por otra parte, también observaron intervalos de SLP y SG significativamente más cortos en pacientes con CTCs positivas para CK y negativas para PR. Estos datos, sugieren que la ausencia de expresión de receptores hormonales en CTCs es un factor que indica peor pronóstico en pacientes con CMTN (Agelaki et al., 2017).

Curiosamente, tras la administración de quimioterapia, la frecuencia de CTCs positivas para HER2 se vió reducida, mientras que esto no ocurrió en las CTCs que expresaban PR o ER. Esta observación, sugiere una eficacia diferencial de la quimioterapia para eliminar las distintas subpoblaciones de CTCs (Agelaki et al., 2017).

Por otra parte, está descrita la alta expresión de marcadores EMT y de célula madre en las CTCs de este tipo de pacientes, dando lugar a fenotipos altamente resistentes a la quimioterapia convencional. Por estos motivos es de gran importancia contar con nuevos agentes terapéuticos con el fin de eliminar estas CTCs quimio-resistentes (Aktas et al., 2009; Kallergi et al., 2011; Kasimir-Bauer et al., 2016; Kasimir-Bauer, Hoffmann, Wallwiener, Kimmig, & Fehm, 2012; Papadaki et al., 2014).

Por otra parte, es importante remarcar que la presencia de CTC positivas para CKs y para HER2 en pacientes con CMTN metastásico, se encontró significativamente incrementado en comparación con pacientes con estadios tempranos. Este hallazgo sugiere que esta subpoblación celular presenta una mayor agresividad y predomina durante la evolución de la enfermedad en pacientes con tumores TN y que por lo tanto sería indicado el uso de terapia dirigidas para la eliminación dicha subpoblación celular (Agelaki et al., 2015; Georgoulas et al., 2012). En otro estudio, Bulfoni y colaboradores describieron la presencia de una subpoblación celular de CTCs que no expresaba marcadores epiteliales ni mesenquimales y que se encontraba significativamente aumentada en pacientes con CMTN (Bulfoni et al., 2016).

Asimismo, Balacescu y colaboradores describieron que en la fracción de linfocitos de pacientes con CMTN se puede observar un enriquecimiento en vías de señalización relacionadas con inmunidad. Este enriquecimiento correlaciona con la inflamación y la necrosis en el tumor primario, sugiriendo la posibilidad de utilizar la inmunoterapia en combinación con la quimioterapia con el fin de mejorar pronóstico de este tipo de pacientes (Balacescu et al., 2016).

Finalmente, es importante destacar que en un estudio recientemente publicado por nuestro grupo de investigación y directamente vinculado al trabajo de la presente tesis doctoral, hemos conseguido generar por primera vez un CDx a partir de CTCs aisladas de una paciente con CMTN con alta carga tumoral. La

caracterización transcriptómica del tumor generado en CDx en comparación con el tejido primario y las metástasis de las pacientes nos ha permitido identificar las rutas y moléculas claves para la evolución de la enfermedad de esta paciente. Por ejemplo, identificamos la vía de WNT como una vía altamente modulada en la progresión tumoral de la paciente así como un conjunto de genes expresados de forma diferencial en las CTCs de esta y otras pacientes con tumores TN con valor pronóstico, como es el caso del gen *MELK* (Pereira-Veiga et al., 2018).

Todos estos resultados ratifican el interés que tiene el análisis de CTCs en pacientes con CMTN como una valiosa herramienta clínica en un tumor con limitados marcadores para el pronóstico y seguimiento, así como dianas terapéuticas efectivas que sirvan para bloquear el proceso de metástasis.

#### **1.3.4 CTCs en cáncer de ovario**

Como se ha comentado en el apartado de CTCs en CMTN, recientes estudios han descrito la presencia de una subpoblación de CTCs que muestra características de EMT en pacientes con tumores de origen epitelial (Joosse & Pantel, 2013). Esta podría ser una de las causas que justifique la ausencia de correlación de los niveles de CTCs con las características clínico-patológicas ni con el pronóstico de pacientes con cáncer de ovario encontrada utilizando el CellSearch<sup>®</sup> (Menarini-Silicon Biosystems) para su enumeración (X. Cheng, Zhang, Chen, & Qing, 2017; Lou et al., 2018). Aunque mediante el uso de otros métodos basados en propiedades biofísicas de las células se ha obtenido mejores resultados, sigue existiendo la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan la evaluación de las CTCs como biomarcadores en cáncer de ovario (J. F. Liu et al., 2013).

Por los motivos mencionados, es de gran importancia la búsqueda de nuevos marcadores diferenciales que permitan la captura de las CTCs (Kolostova et al., 2016). Un estudio reciente ha descrito

el interés del gen *PPIC* como marcador de CTCs. Este gen se encontró sobre-expresado en aproximadamente el 70% de las muestras con CTCs positivas por lo que constituye un marcador interesante para dirigir su estrategia de aislamiento (Obermayr et al., 2013).

Uno de los estudios más recientes sobre CTCs en este tumor, que incluyó 95 pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario en los hospitales clínicos de Essen y Dresden (Alemania), se centró en el análisis de la expresión de marcadores epiteliales (EpCAM, MUC-1 y CA-125) y marcadores con vinculación a EMT (PI3K, AKT y TWIST) mediante el uso de AdnaTest. Este estudio describió que antes de la cirugía se detectaban CTCs epiteliales en un 18% de las pacientes. Este número descendió al 14% tras la administración de quimioterapia basada en platinos. Estos datos concuerdan con los de otros estudios anteriores (Aktas, Kasimir-Bauer, Heubner, Kimmig, & Wimberger, 2011; Chebouti et al., 2017; Obermayr et al., 2013). Por otra parte, un 30% de las pacientes presentaron CTCs con fenotipo EMT en el análisis previo a cirugía. Tras la administración de quimioterapia este porcentaje se incrementó hasta el 52% (Chebouti et al., 2017). Antes de la cirugía, el 58% de los pacientes con CTCs detectables presentaron CTCs positivas para marcadores de EMT, el 24% presentaron CTCs positivas para marcadores epiteliales y el 18% presentaron células positivas para ambos grupos de marcadores. Tras la administración de quimioterapia basada en platinos posterior a la cirugía, estos valores cambiaron, siendo un 76% las pacientes con CTCs EMT positivas, un 12% los pacientes con CTCs positivas para marcadores epiteliales y un 12% las que presentan un fenotipo mixto. Estos resultados sugieren que la quimioterapia basada en platinos selecciona positivamente las CTCs con fenotipo EMT (Chebouti et al., 2017).

Con respecto a los marcadores epiteliales, en el análisis previo a cirugía, MUC-1 se detectó en el 62% de las CTCs, EpCAM en el 19% de las CTCs y el 19% restante perteneció a células doble positivas. CA-125 no se detectó en ninguna de las células. También se

observó que tras la administración de quimioterapia basada en platinos la población de células doble positivas desaparece por completo (Chebouti et al., 2017). Con respecto a los marcadores EMT, en el análisis previo a cirugía, AKT se detectó en el 19% de las CTCs, PI3K en el 12%, TWIST en el 42%, PI3K/AKT en un 15%, AKT/Twist en un 4% y células PI3K/AKT/TWIST en un 8% de los casos. Tras la administración de la quimioterapia basada en platinos la principal diferencia es la emergencia de una población doble positiva para PI3K/TWIST que pasa a representar el 13% y va en detrimento de la población PI3K/AKT que pasa a representar el 6% (Chebouti et al., 2017).

En cuanto a la relevancia clínica de monitorizar las CTCs, se ha descrito que antes de la cirugía la presencia de CTCs PI3K positivas en combinación con la presencia de CTCs con fenotipo epitelial indica un peor intervalo de SG. Por otra parte, después de la administración de quimioterapia, en pacientes en estadios I-III, se ha observado un descenso en SG en pacientes con presencia de CTCs PI3K positivas en combinación con la presencia de CTCs con fenotipo epitelial y un descenso en SLP en pacientes con presencia de CTCs con fenotipo epitelial (Chebouti et al., 2017). Un estudio de 2014 apuntó a que la presencia de CTCs ERCC1 positivas a diagnóstico es un marcador predictivo independiente para la resistencia a platinos (Kuhlmann et al., 2014). Se ha descrito también que la presencia de CTCs OVCA positivas se asocian a una menor SG en pacientes con citorreducción óptima y a un peor pronóstico en pacientes en adyuvancia (Obermayr et al., 2017).

Otro estudio describió un panel de seis genes (*CCNE2*, *DKFZ*, *EMP2*, *MAL2*, *PPIC* y *SLC6A8*) que permitió, mediante su análisis en CTCs enriquecidas de sangre periférica, la identificación del 19% de las pacientes de ovario estudiadas (Obermayr et al., 2010). Por otro lado, utilizando un sistema de enriquecimiento de CTCs basado en la separación por tamaño mediante filtración (MetaCell) se identificó una sobre-expresión significativa de los genes *CK17*, *WT1*, *EPCAM*, *MUC16*, *MUC1*, *CK18* y *CK19* en la fracción enriquecida (Kolostova

et al., 2016) de CTCs de pacientes con tumores de ovario. Asimismo, recientemente Obermayr y colaboradores describieron que el análisis por FISH de fusiones de los genes *MECOM* y *HHLAI* en CTCs de paciente con cáncer de ovario es un método eficaz para la detección de enfermedad mínima residual tras la cirugía curativa en pacientes con cáncer de ovario (Obermayr et al., 2017).

La habilidad para capturar, enriquecer y propagar CTCs para su posterior análisis es una de las prioridades en este campo, debido a su gran importancia tanto para la investigación básica como para la investigación translacional. La tecnología de Vitatex Inc. para separación celular, derivada de la tecnología Vita-Assay<sup>TM</sup>, se basa en la adhesión preferencial de las células de origen epitelial en sangre a una matriz de adhesión que recrea el microambiente tumoral, y ha demostrado ser eficiente para el enriquecimiento de CTCs viables. Esta matriz está marcada fluorescentemente y al ser ingerida por las células permite acoplar esta técnica a la citometría de flujo y a la microscopía de fluorescencia para la detección de las mismas. En concreto ha sido utilizada con éxito para llevar a cabo ensayos de sensibilidad frente a fármacos en CTCs de pacientes con cáncer de ovario (Tulley, Zhao, Dong, Pearl, & Chen, 2016).

A mayores de los resultados de los mencionados estudios que tratan de comprender mejor la biología de la población tumoral circulante en cáncer de ovario y determinar su valor como marcador de pronóstico y seguimiento, es necesario avanzar en la mejora de la eficiencia de detección y caracterización de estas células para que puedan convertirse en una herramienta útil para el manejo clínico de las pacientes con esta patología.





# **OBJETIVOS**



## 2-OBJETIVOS

A pesar de la continua evolución de las técnicas de prevención, diagnóstico y tratamiento, los tumores de mama y ovario siguen estando entre los que afectan a mujeres con mayor prevalencia en el caso de mama y con mayor agresividad en el caso de ovario. Clásicamente para avanzar en la comprensión de la biología de este tipo de tumores los estudios se han basado en la caracterización del tumor primario. Sin embargo, hay un paso clave en la progresión tumoral, la presencia de CTCs en sangre, que hasta la fecha no ha sido suficientemente estudiado.

El proceso mediante el cual las células tumorales abandonan el tumor primario, intravasan a los vasos sanguíneos y luego son capaces de extravasar a órganos diana y formar metástasis presenta aún muchas incógnitas. Se sabe que para que las células tumorales se desprendan del tumor primario y formen nuevos focos tumorales epiteliales han de sufrir el fenómeno de EMT para que pierdan sus propiedades de adherencia y adquieran un fenotipo más migratorio. Al mismo tiempo, se produce un aumento en la actividad catalítica de distintas proteasas que degradan la matriz extracelular y facilitan la migración de las células tumorales. Una vez en sangre, estas células tienen que ser capaces de sobrevivir e implantarse en un nuevo tejido para lo que se cree que es necesario el proceso de transición mesénquima-epitelio (MET). En este contexto, el aislamiento y caracterización de CTCs de sangre de pacientes, presenta un gran potencial para comprender mejor la biología de estos tumores y para encontrar nuevas herramientas moleculares que ayuden a los clínicos a establecer terapias más dirigidas y eficaces.

Por todo ello, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de comprender mejor los mecanismos moleculares que permiten la progresión de estos dos tipos de tumores a través del estudio de las CTCs, principales responsables del proceso de diseminación, para identificar nuevos marcadores tumorales y potenciales dianas

terapéuticas. Para ello se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- 1- Analizar los niveles de CTCs en pacientes con CMTN y cáncer de ovario avanzado para determinar su valor como marcador pronóstico.
- 2- Caracterizar a nivel molecular la población de CTCs de pacientes con CMTN y de ovario avanzado, prestando especial atención a genes implicados en plasticidad celular, con el objetivo de identificar marcadores pronóstico y moléculas clave para el proceso de diseminación y progresión tumoral.
- 3- Validar el papel en el proceso de carcinogénesis y diseminación tumoral de los candidatos identificados en el estudio transcriptómico de las CTCs de ambos tipos tumorales mediante la utilización de modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*.
- 4- Comparar el perfil génico diferencial de las CTCs y tejido primario y/o metastásico de pacientes con CMTN para identificar alteraciones genéticas asociadas al proceso de diseminación tumoral y describir el grado de heterogeneidad molecular que presenta la población de CTCs.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **3-MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 COHORTES DE PARTICIPANTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO**

Para la realización del presente estudio se utilizaron dos cohortes de pacientes. Una en la que se incluyeron pacientes con CMTN y otra en la que se incluyeron pacientes con cáncer de ovario.

En la cohorte de CMTN se incluyeron un total de 32 pacientes diagnosticadas con CMTN en estadios III y IV tratadas en el Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela) en el MD-Anderson Cancer Center (Madrid, España) y en el Instituto Catalán de Oncología (Barcelona), cuyas características principales se describen en la Tabla 3. Paralelamente también se incluyeron 30 mujeres sanas con edad similar a la cohorte de las pacientes como controles.



**Tabla 3: Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en la cohorte de CMTN.**

Edad	Media (años)
	58,5 (33-80)
Estadio a fecha muestra	n (%)
III	9 (28%)
IV	23 (72%)
Estado a Fecha de Muestra	n (%)
Diagnóstico	24 (75%)
Recurrencia	8 (25%)
Metástasis a fecha de muestra	n (%)
Ósea y Visceral	4 (17%)
Visceral	17 (74%)
Desconocida	2 (9%)
Histología	n (%)
Ductal	29 (91%)
Lobulillar	1 (3%)
Metaplásico	2 (6%)
Grado Histológico	n (%)
2	22 (68,7%)
3	10 (31,3%)
Cirugía Previa	n (%)
Si	23 (72%)
No	9 (28%)
Tratamiento a fecha de muestra	
Si	5 (15,6%)
No	27 (84,4%)
Ki67 a diagnóstico	
Alto	4 (17%)
Bajo	27 (84,4%)
Desconocido	1 (3%)
Recurrencia	
Progresiones	20 (62,5%)
SLP (mediana meses)	12,4 (0,56-45,2)
Supervivencia	
Exitus	17 (53%)
SG (mediana meses)	18,4 (0,56-45,2)

En el estudio de cáncer de ovario, se incluyeron 38 pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario avanzado en el MD-Anderson Cancer Center (Madrid) de acuerdo con la clasificación de la FIGO. Es importante mencionar que 25 de las pacientes se incluyeron a diagnóstico y 11 a recurrencia (Tabla 4). En esta cohorte también se incluyeron 20 mujeres sanas como controles.

**Tabla 4: Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en el estudio de cáncer de ovario.**

Edad	Media (años)
	58 (23-83)
Estado a fecha de muestra	n (%)
IV	30 (79%)
Desconocido	8 (21%)
Estado a fecha de muestra	n (%)
Diagnostico	25 (65,8%)
Recurrencia	11 (28,9%)
Desconocido	2 (5,3%)
Metástasis a fecha de muestra	n (%)
Peritoneal	19 (50%)
Extraperitoneal	11 (28,9%)
Desconocida	8 (21%)
Histología	n (%)
Seroso	26 (68,4%)
Endometrioides	3 (7,9%)
Otros	6 (15,8%)
Desconocido	3 (7,9%)
Grado Histológico	n (%)
Alto	36 (94,7%)
Desconocido	2 (5,3%)
BRCA	n (%)
Mutante	10 (26,3%)
Nativo	26 (68,4%)
Desconocido	2 (5,3%)
Tratamiento a fecha de muestra	n (%)
Si	9 (23,7%)
No	29 (76,3%)
CA125 a diagnostico	n (%)
> 35	24 (63,2%)
< 35	3 (7,9%)
Desconocido	11 (28,9%)
Recurrencia	n (%)
Progresiones	12 (31,5%)
SLP (mediana meses)	22,8 (0,39-49,1)
Supervivencia	n (%)
Exitus	6 (15,8%)
SG (mediana meses)	29,9 (0,39-49,1)

En el caso del estudio de CMTN los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de Galicia (2013/462), mientras que en el caso del estudio de cáncer de ovario, las muestras fueron obtenidas a través del biobanco de la Fundación

MD-Anderson (B.0000745, registro nacional de biobancos ISCIII). Para la cesión de las mismas se contó con el consentimiento informado de las pacientes, y su análisis fue aprobado por el Comité Ético y Científico de la institución siguiendo los procedimientos establecidos en la ley actual de Investigación Orgánica Biomédica de 14 de julio 2007 y en el Real Decreto de Biobancos 1716/2011, en este caso, todos los datos se basan en información anónima. Es importante mencionar que todas las pacientes y mujeres sanas incluidas en las dos cohortes firmaron el pertinente consentimiento informado. A su vez, contamos con una aprobación general del Comité Ético de Investigación de Galicia (2017/538) para la identificación de marcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento mediante el análisis de biopsia líquida en pacientes con cáncer, que nos permite el análisis de distintos tipos de muestras recibidas de otros centros, como en este caso el MD-Anderson.

## **3.2 MODELOS CELULARES**

### **3.2.1 Cultivo de células tumorales humanas de cáncer de mama y ovario**

Los estudios funcionales del presente trabajo se han llevado a cabo utilizando dos líneas tumorales modelo para CMTN y cáncer de ovario, las MDA-MB 231 y las SKOV3, respectivamente (Anglesio et al., 2013; K. Liu et al., 2019).

Las MDA-MB 231 proceden de la ATCC (HTB-26) y derivan de un adenocarcinoma primario de mama ER, PR, y HER2 negativo. Esta línea presenta una aneuploidía con contaje cromosómico triploide y se caracteriza por la ausencia de los cromosomas normales 8 y 15. Para llevar a cabo los distintos ensayos la línea celular se mantuvo en cultivo a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivó en medio DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, South America) y un 1% de penicilina-estreptomina (Gibco, Grand Island, NY, USA).

La línea SKOV-3, procedente también de la ATCC (HTB-77), deriva de ascitis de una paciente con adenocarcinoma de ovario. Se caracteriza por su hipodiploidía presentando únicamente 43 cromosomas. Esta línea celular se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivó en medio McCoy's 5A (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, South America) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA).

### **3.2.2 Silenciamiento de TIMP-1 mediante shARN**

Con el objetivo de bloquear la expresión de TIMP-1 en las líneas celulares MDA-MB 231 y SKOV-3 se utilizaron partículas lentivirales que contienen constructos comerciales dirigidos a bloquear la traducción del ARNm que da lugar a la proteína (Mission Lentiviral Transduction Particles, Sigma, St. Louis, MO, USA). Se utilizaron 4 shARNs diferentes (Tabla 5), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y una concentración final de Polibrene (Hexadimetilbromide; Sigma) de 8 µg/ml. A su vez se utilizaron como control partículas comerciales que contienen un shARN dirigido frente a una secuencia no presente en mamíferos (Mission Non-Mammalian shARN Control Transduction Particles, Sigma, St. Louis, MO, USA). Las líneas se seleccionaron en presencia de puromicina (5 µg/ml). Las líneas silenciadas se nombraron en ambas líneas (MDA-MB 231 y la SKOV-3) como shTIMP1\_1, shTIMP1\_2, shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4 mientras que la línea control se denominó PLKO.

La eficacia del silenciamiento fue comprobada mediante RT-q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa a tiempo real) y Western Blot (WB).

Por otra parte, la línea celular parental MDA-MB 231 fue infectada con partículas virales para inducir en ella la expresión estable de GFP y luciferasa (Lentiviral Particles for Firefly Luciferase, GeneCopoeia, Maryland, USA) (Tabla 5) para su uso en los ensayos

*in vivo* realizados para testar el efecto del bloqueo de la vía androgénica en esta línea celular.

**Tabla 5: Partículas lentivirales y secuencias de los shARNs utilizados para la transfección de las líneas celulares.**

Oligo	Referencia	Casa Comercial	Secuencia
Control	SHC002V	Sigma-Aldrich	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTT
shTIMP1#1	TRCN0000052428	Sigma-Aldrich	CCGGGCACAGTGTTCCTGTTTATCTCGAGATAAACAGGGAAACACTGTGCTTTTTG
shTIMP1#2	TRCN0000052429	Sigma-Aldrich	CCGGCCAGCGTATGAGATCAAGATCTCGAGATCTTGATCTCATAACGCTGGTTTTTG
shTIMP1#3	TRCN0000299344	Sigma-Aldrich	CCGGGAAGTCAACCAGACCACCTTACTCGAGTAAGTGGTCTGTTGACTCTTTTTTG
shTIMP1#4	TRCN0000303681	Sigma-Aldrich	CCGGACAGACGGCCTTCTGCAATTCCTCGAGGAATTGCAGAAGGCCGTCTGTTTTTG
GFP_luc	#LPP-hLUC-Lv201-025-C	GeneCopoeia	LUC: GeneBank: M15077.1 GFP: GeneBank: AY268072.1

### 3.2.3 Tratamiento con inhibidores de la vía androgénica

En los ensayos que tuvieron como objetivo bloquear la vía androgénica, las células MDA-MB 231 fueron tratadas con una concentración 10  $\mu$ M de abirterona (Selleck Chemicals, USA) y una concentración 10  $\mu$ M de enzalutamida (Selleck Chemicals, USA) respectivamente. Esta concentración se calculó previamente en un ensayo de toxicidad, utilizando concentraciones crecientes (1, 5, 10, 20, 30  $\mu$ M) de cada uno de los compuestos, mediante el cual se determinó la máxima concentración que no produjo muerte celular, para de este modo poder evaluar el efecto del bloqueo de esta vía a nivel funcional.

### 3.2.4 Tratamiento con Carboplatino y Paclitaxel

En los ensayos que tuvieron como objetivo evaluar el efecto del Carboplatino (Accord Healthcare) y el Paclitaxel (Accord Healthcare) sobre las células MDA-MB 231 y sus respectivos silenciamientos, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de ambos compuestos respectivamente (Paclitaxel: 1, 2, 5, 10, 15 y 20 nM / Carboplatino: 2, 6, 12,5, 25, 37,5 y 50  $\mu$ M).

### **3.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

#### **3.3.1 Extracción de ARN total de tejidos parafinados**

Las muestras de tejido sano y tumoral (tumor primario y/o metástasis) seleccionadas para este estudio, fueron facilitadas por el Biobanco del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y consistieron en cortes de parafina de 10 µm de grosor. La extracción del ARN se llevó a cabo a partir de un máximo de 4 secciones, empleando el kit de extracción miRNeasy FFPE Kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando solución para desparafinización (Quiagen, Hilden, Germany). Las muestras se almacenaron a -80°C. El ARN obtenido se cuantificó mediante la tecnología Nanodrop (ThermoFisher).

#### **3.3.2 Extracción de ARN total de líneas celulares**

El ARN total de las líneas celulares se extrajo mediante el uso del kit High Pure ARN Isolation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) siguiendo las instrucciones de fabricante. Previamente las células se lavaron en PBS y se recogieron de la placa de cultivo con ayuda de un *scraper*. Las muestras se almacenaron a -80°C.

#### **3.3.3 Extracción del ARN total de CTCs de pacientes**

El ARN total de las células tumorales circulantes se extrajo mediante el uso del kit QIAMP Viral ARN Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones de fabricante. Las muestras se almacenaron a -80°C.

#### **3.3.4 Retrotranscripción**

Mediante el proceso de retrotranscripción, el ARN mensajero se transforma en ADN complementario (ADNc) mediante la acción de

la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa. El ADNc es de doble cadena y presenta una mayor estabilidad que el ARN molde.

La retrotranscripción del ARN procedente de las muestras de **tejido y líneas celulares**, se llevó a cabo mediante el uso del kit Gen Amp ARN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acuerdo con el siguiente protocolo: 9  $\mu$ l de ARN se mezclaron con 4  $\mu$ l de  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l de Buffer 10X, 2  $\mu$ l de dNTP mix, 1  $\mu$ l de Random Hexamers, 1  $\mu$ l de Enzima Mul-V retrotranscriptase y 1  $\mu$ l de ARNse inhibitor. El proceso se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 42°C, 45 minutos; 95°C, 5 minutos y un paso final de 4°C. Las muestras se almacenaron a -20°C.

La retrotranscripción del ARN procedente de **CTCs** de pacientes se llevó a cabo mediante el uso del kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el siguiente protocolo: 11  $\mu$ l de ARN se mezclaron con 1  $\mu$ l de Random Hexamers y 1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) y se incubó en termociclador durante 5 minutos a 65°C, y posteriormente se dejó en hielo. Tras este paso, se preparó la mezcla de: 4  $\mu$ l de First-Strand Buffer 5X, 1  $\mu$ l DTT 0.1 M, 1  $\mu$ l de ARNse out, 1  $\mu$ l de SuperScript III Retrotranscriptase y se incubó en termociclador con las siguientes condiciones: 25°C, 5 minutos; 50°C, 2 horas; 70°C, 15 minutos. Para finalizar se añadió 1  $\mu$ l de ARNse H y se incubó 20 minutos a 37°C. Las muestras se almacenaron a -20°C.

### **3.3.5 Preamplificación**

Previo al análisis por RT-q-PCR y con el fin de maximizar las tasas de detección se llevó a cabo un proceso de pre-amplificación en las muestras de ADNc procedentes de tejido FFPE y de las CTCs, este proceso no se llevó a cabo en las muestras procedentes de líneas celulares, ya que debido a su alta concentración, no fue necesario.

El proceso se llevó a cabo mediante el uso del kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando las sondas TaqMan correspondientes a los genes que fueron preamplificados. Las muestras se incubaron en termociclador con las siguientes condiciones 95°C, 10 minutos y 14 ciclos de 95°C, 15 segundos y 60°C, 4 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C. Este proceso permite incrementar la sensibilidad de detección entre 6-7 Ct (del inglés *threshold cycle*) sin variar las proporciones originarles de la muestra.

### 3.3.6 RT-q-PCR

La RT-q-PCR es una técnica que permite la detección y cuantificación de los productos generados durante cada ciclo del proceso de PCR. Para ello se incorpora un oligonucleótido, unido a una molécula marcada fluorescentemente, que hibrida con la secuencia del gen diana. Durante la PCR esta molécula fluorescente se libera debido a la acción de la polimerasa permitiendo la detección de la señal.

Se utilizó este método para determinar los niveles de expresión de diferentes genes dentro de este estudio. La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en la plataforma 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de 5 µl de una dilución de ADNc diluido en TE en una proporción 1:10, 1 µl de sonda, 4 µl de agua libre de nucleasas y 10 µl de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con las siguientes condiciones: 50°C, 2 minutos; 95°C, 10 minutos y 40 ciclos de 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto. Se utilizaron sondas prediseñadas TaqMan Gene Expression Assay para cada uno de los genes a análisis (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tabla 6)

**Tabla 6: Sondas TaqMan empleadas en los análisis de RT-q-PCR.**

Gen	Sonda TaqMan	Gen	Sonda TaqMan
CD45	Hs_00894734_m1	ALDH2	Hs_01007998_m1
GAPDH	Hs_99999905_m1	SNAIL1	Hs_00195591_m1
ALDH1	Hs_00946916_m1	BCL11A	Hs_01093197_m1
CK19	Hs_00761767_s1	AR	Hs_00171172_m1
CXCR4	Hs_00607978_s1	CRIPTO1	Hs_02339499_g1
MUC1	Hs_00159357_m1	EGFR	Hs_01076090_m1
CD24	Hs_00273561_s1	ZEB2	Hs_00207691_m1
CD44	Hs_01075861_m1	CD133	Hs_01009250_m1
TIMP1	Hs_00171558_m1	CDH12	Hs_00362037_m1
CDH1	Hs_00170423_m1	LOXL2	Hs_00158757_m1
VIM	Hs_00958116_m1	GDF1	Hs_00242151_m1
CD49F	Hs_01041011_m1	ZEB1	Hs_01566407_m1
EPCAM	Hs_00158980_m1	FUT8	Hs_00189535_m1
		ANXA2	Hs_01561520_m1

Los datos se analizaron con el software StepOne v.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y con Microsoft Excel 2011 para Macintosh (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

En el caso de **líneas celulares** y **tejido** la expresión se representó como 40-Ct y se utilizó la expresión del gen que codifica para la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como normalizador.

En el caso de las **CTCs** la expresión se representó como 40-Ct y se utilizó la expresión del gen del receptor tipo C de la proteína tirosina fosfatasa (*PTPRC*, *CD45*) como normalizador e indicador de aislamiento inespecífico de células sanguíneas.

### 3.4 AISLAMIENTO Y CONTAJE DE CTCs

#### 3.4.1 Aislamiento mediante el kit CELlection Epithelial Enrich

Las CTCs de las pacientes con CMTN se aislaron utilizando el kit CELlection™ Epithelial Enrich (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este kit está compuesto por micropartículas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-EpCAM.

Para este aislamiento partimos de un tubo EDTA vacutainer (Becton Dickinson) con 7,5 ml de sangre periférica de las pacientes, los cuales se mezclaron con 15 ml de tampón T2 (PBS 1X, BSA 0,1%, EDTA 2 mM), se centrifugaron a 1250 xg durante 15 minutos en modo lento y se descartó la fracción de plasma sobrenadante. El *pellet* se resuspendió con 7,5 ml de tampón T2 y se añadieron 100 µl de partículas magnéticas, previamente activadas con una incubación en imán durante un minuto en tampón T1 (PBS 1X, BSA 0,1%). Tras incubar la muestra a 4°C durante 30 minutos en una noria, se aislaron las CTCs unidas a las partículas mediante el uso de un imán. Se llevaron a cabo 3 lavados con 1 ml de tampón T1 recuperando las partículas magnéticas con las células unidas tras una incubación de 4 minutos en el imán. La muestra se resuspendió finalmente en 100 µl de ARNlater (Ambion, Austin, TX, USA) y se almacenó a -80°C.

El mismo protocolo se replicó en muestras de sangre de voluntarias sanas, para así poder evaluar el aislamiento inespecífico de células sanguíneas llevado a cabo mediante esta técnica.

### **3.4.2 Aislamiento y conteo mediante el sistema CellSearch**

Las CTCs de las pacientes se aislaron y se cuantificaron mediante la tecnología CellSearch (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) utilizando el kit CellSearch® Circulating Tumor Cell (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia). Esta tecnología consiste en un procedimiento semiautomático mediante el cual se aíslan las células que expresan la molécula de membrana EpCAM mediante el uso de nanopartículas magnéticas unidas a un anticuerpo que reconoce esta proteína, partiendo de un tubo CellSave Preservative Tube (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) con 7,5 ml de sangre periférica. Por otra parte, el núcleo celular se marca con DAPI y se lleva a cabo una inmunofluorescencia para detectar las células de origen sanguíneo, utilizando un anticuerpo anti-CD45 y las células de origen epitelial con un anti-panCKs (CK8, 18 y 19). Las imágenes de las células aisladas se adquirieron utilizando un microscopio de fluorescencia semi-automático (Celltraks Analyzer II)

y personal experimentado seleccionó las CTCs de acuerdo al siguiente criterio: morfología redondeada,  $\geq 4 \mu\text{m}$ , nucleadas (DAPI<sup>+</sup>), negatividad para el marcaje con CD45 y positividad para el marcaje con CKs.

### **3.4.3 Aislamiento y recuperación de células puras mediante la tecnología DEPArray**

Las CTCs de las pacientes se aislaron y se cuantificaron mediante la tecnología CellSearch<sup>TM</sup> (Menarini, Silicon Biosystems, Bologna, Italia) a partir de muestras de sangre periférica, estos aislamientos se llevaron a cabo en colaboración con la Fundación Pública de Medicina Xenómica de Santiago de Compostela y con el Istituto Nazionale dei Tumori de Milán. En las pacientes con  $>10$  CTCs la fracción enriquecida fue almacenadas en los cartuchos CellSearch<sup>TM</sup> a 4°C y en vertical (Menarini, Silicon Biosystems, Bologna, Italia). Partiendo de dichas fracciones enriquecidas en CTCs almacenadas en los cartuchos CellSearch<sup>TM</sup> se llevó a cabo un segundo aislamiento mediante la tecnología DEPArray<sup>TM</sup> (Menarini, Silicon Biosystems, Bologna, Italia), el cual permitió el aislamiento tanto de células individualizadas como de grupos de células puros.

DEPArray<sup>TM</sup> es una plataforma automática diseñada para aislar y recuperar células individualizadas. El instrumento está basado en la dielectroforesis, un principio electrocinético mediante el cual, creando un campo eléctrico no uniforme, se ejercen fuerzas en partículas neutras como las células. El campo eléctrico se crea dentro de un cartucho microfluídico (DEPArray<sup>TM</sup> cartridge) al cual se transfieren las fracciones enriquecidas en CTCs aisladas mediante CellSearch<sup>TM</sup>, en dicho cartucho se forman “jaulas eléctricas” alrededor de las células, permitiendo que estas sean atrapadas. El sistema DEPArray<sup>TM</sup> está equipado con un microscopio de fluorescencia de seis canales y una cámara digital que captura imágenes y permite la identificación celular mediante su marcaje fluorescente y sus características morfológicas. Las imágenes obtenidas pueden ser analizadas mediante el software específico de

DEPArray™ permitiendo la selección y la recuperación de las células de interés en un tubo para su posterior análisis.

El protocolo comenzó con el traspaso de la muestra desde los cartuchos CellSearch™ a los cartuchos DEPArray™. Mediante el uso de una micropipeta con puntas para cargar geles recubiertas con PBS-BSA 2%, se retiró la muestra de los cartuchos CellSearch™ y se pasó a un tubo. Posteriormente los cartuchos CellSearch™ fueron lavados dos veces con un buffer de baja conductividad (SB115) con el fin de recuperar los restos de muestra que hubiese podido quedar, por otra parte, este buffer optimiza el proceso de recuperación de DEPArray™. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 300 xg, se lavaron en 1 ml de SB115 y finalmente se resuspendieron en 14 ml de SB115.

Los cartuchos DEPArray™ se cargaron con estos 14 ml y 800 µL de SB115 para recuperar las células. Tras insertar el cartucho en el equipo DEPArray™ 9,26 ml de la muestra, fueron automáticamente inyectados en una microcámara del cartucho en donde las células se ordenaron en un campo eléctrico formado por 16.000 posiciones. Una vez ordenadas se tomaron imágenes de todas las células (CK, CD45, DAPI y luz transmitida) y se les asignó un identificador. Estas imágenes fueron analizadas y se seleccionaron las células de interés que fueron recuperadas individualmente en 30-40 µL de SB115, en tubos de 200 µL. Finalmente se llevó a cabo un proceso de reducción de volumen para dejar las células en 1 µL de SB115.

### **3.5 ANÁLISIS GENÓMICOS**

#### **3.5.1 Amplificación de genoma completo mediante el kit Ampli1 WGA**

El contenido de ADN de una célula única es muy escaso (6pg) para llevar a cabo cualquier tipo de análisis posterior al aislamiento, por este motivo es necesario llevar a cabo una amplificación de

genoma completo con el fin de poder contar con una cantidad de ADN suficiente para su análisis.

Dicha amplificación de genoma completo se ha llevado a cabo en las células aisladas mediante la tecnología DEPArray<sup>TM</sup> utilizando el kit comercial basado en PCR Ampli1 WGA (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Menarini, Silicon Biosystems recomienda el uso de este kit en combinación con un kit de control de calidad basado en PCR Ampli1 QC (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) que permite evaluar la calidad de los productos de la amplificación de genoma completo. Una pequeña parte del producto de la amplificación se procesó mediante una PCR multiplex de control de calidad, la cual permite la amplificación de cuatro regiones genómicas humanas de longitud creciente (91, 108-166, 299 y 614 pb). La calidad de los productos de la amplificación de genoma completo se estimó mediante la observación del producto de PCR de control de calidad en un gel agarosa. La ausencia de bandas sugirió un fallo en la amplificación de genoma completo, la presencia de una o dos bandas determinó una baja-media calidad del producto de amplificación, mientras que la presencia de tres o cuatro bandas aseguró que la amplificación se realizó de forma óptima.

### **3.5.2 Extracción de DNA total de tejidos parafinados**

Para el estudio comparativo entre el perfil mutacional de la población de CTCs y el tejido tumoral mediante NGS se obtuvieron muestras de tejido en parafina facilitadas por los Biobancos del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y del Hospital Universitario de Bellvitge. Consistieron en cortes de parafina de 10 micras de grosor en los que el tumor representaba el 80% de la superficie del bloque. La extracción de ADN a partir de estas muestras se llevó a cabo a partir de un máximo de 4 secciones, empleando el kit de extracción QIAamp FFPE Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras obtenidas se

almacenaron a -20°C. El ADN obtenido se cuantificó mediante la tecnología Qubit 2.0 (Promega).

### **3.6 SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA DIRIGIDA**

La secuenciación masiva paralela dirigida, se llevó a cabo utilizando la plataforma S5 System (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este estudio de secuenciación se realizó en colaboración con el Laboratorio de Investigación Traslacional en Cáncer de la Fundación MD Anderson Internacional (Madrid) dirigido por la Dra. Gema Moreno Bueno.

#### **3.6.1 Construcción de las librerías**

Una vez extraído el DNA fue cuantificado mediante la tecnología Qubit (Thermo Fisher) de acuerdo a protocolos establecidos. Para la generación de la librería de DNA, se utilizaron 10 ng del ADN extraído que inicialmente fue amplificado mediante una PCR con AmpliSeq Library Kit 2.0 y el panel Oncomine Comprehensive Assay v3 (Thermo) siguiendo las indicaciones del proveedor. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador AB 2720 (ThermoFisher) utilizando el siguiente ciclo de amplificación: 99°C, 2 minutos; seguido de 16-22 ciclos de 99°C, 30 segundos / 60°C, 3 minutos. Brevemente el panel de DNA de Oncomine permite el análisis simultaneo de 87 regiones consideradas *hotspot* (altamente modificadas en cáncer), 48 genes completos y 43 genes para determinación de ganancia de copias (detalle de los genes analizados: [www.thermofisher.com/order/catalog/product/A36111](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A36111)). Tras la amplificación se llevo a cabo la digestión de los oligonucleótidos utilizando FuPa (50°C, 10 minutos; 55°C, 10 minutos; 60°C, 10 minutos; 10°C hasta 1 hora). A continuación, se añadió a los productos amplificados los adaptadores Ion P1 y un código de barra específicos Ion Xpress Barcode para cada muestra, lo que permitió la secuenciación conjunta de todas las muestras. Siguiendo alas especificaciones de la casa comercial las librerías de DNA obtenidas fueron purificadas y cuantificadas utilizando una PCR

cuantifica en tiempo real utilizando el kit Ion Library TaqMan Quantitation y el sistema ViiA7 (ThermoFisher). Tras obtener la concentración de cada librería, se seleccionaron 6.8-8 pM.

### **3.6.2 Preparación de los *templates***

La preparación y el enriquecimiento de las librerías de DNA fue llevada a cabo mediante el uso del kit Ion PGM Template OT2 200 Ion PGM Hi-Q OT2 y el sistema OneTouch 2. Se seleccionó 100pM de cada librería de DNA y a continuación se utilizó Template-positive Ion PGM Hi-Q Ion Sphere Particles (ISPs) que permitía la interacción de cada fragmento de DNA amplificado con esferas magnéticas que posteriormente fueron amplificadas mediante una PCR en emulsión en el sistema Ion OneTouch 2 seguida de un enriquecimiento ejecutado mediante el sistema Ion OneTouch ES. Las esferas portadoras de fragmentos de DNA amplificado (ISPs enriquecidas) se almacenaron entre 2°C y 8°C hasta 3 días.

### **3.6.3 Secuenciación**

El kit de secuenciación Ion PGM Sequencing 200 Ion PGM Hi-Q Sequencing y el sistema S5 (ThermoFisher) fue utilizado para la Secuenciación Dirigida de Nueva Generación de acuerdo a los protocolos del fabricante. Las ISPs enriquecidas fueron centrifugadas y mezcladas con los cebadores de secuenciación y la polimerasa de secuenciación. Un rango de 12-16 librerías fueron secuenciadas en chips 520 o 530 con el fin de alcanzar la cobertura óptima, con al menos 100 lecturas por base (100X).

### **3.6.4 Análisis bioinformático**

El alineamiento con el genoma humano de referencia Hg19/CRCh38 y la identificación de variantes, se llevó a cabo mediante el uso del software Torrent Suit v.4.2.1 (ThermoFisher). Todas las muestras fueron secuenciadas y analizadas en las mismas condiciones. Las variantes con un valor de calidad Phred-score menor

de 500 fueron consideradas como variantes con poca calidad. La predicción del impacto de las variantes en la función biológica de las correspondientes proteínas fue llevada a cabo mediante la herramienta de análisis Ion Reporter que incluye el alineamiento de las regiones amplificadas contra el genoma de referencia (GRCh37) y analizado su posible efecto en base a alteraciones previamente descritas (bases de datos indexadas: dbSNP, COSMIC database) y posteriormente comprobadas mediante el software de análisis Alamut version 2.0 (Interactive BioSoftware, Rouen, France), que incluye información de cuatro predictores bioinformáticos que calculan el posible efecto deletéreo de la mutación. Aquellas variantes identificadas no descritas previamente fueron tipificadas como posible o probablemente patogénica si al menos tres predictores le conferían un efecto adverso (Predictores: GVDG, SIFT, MutationTaster, Polyphen). Las variantes cuya cobertura de lectura fue inferior a 100 o con una frecuencia menos del 1.5% no se tuvieron en cuenta. Para la elaboración de los árboles filogenéticos, las muestras fueron transformadas en una matriz dicotómica describiendo la presencia (con un valor de 1) o la ausencia (con un valor de 0) de los SNPs y las CNVs seleccionadas y descritas anteriormente. En base a dicha matriz se aplicó el algoritmo filogenético utilizando la distancia de hamming y la estimación Neighbor-Joining Tree utilizando el principio de parsimonia. La visualización de los arboles se llevo a cabo mediante el uso de R.

### **3.7 ESTUDIOS PROTEICOS**

#### **3.7.1 Extracción de proteínas totales de líneas celulares**

Las líneas celulares se lavaron con PBS y se incubaron con buffer de lisis RIPA (Tris-HCl mM, pH 7.4; NP-40 1%; Deoxicolato de Na 0.5%; SDS 0,1%; NaCl 150 mM; EDTA 2mM; NaF 50mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2mM; PIC 1X; PMSF 1X) durante 1 minuto. A continuación, se recogieron con la ayuda de un *scraper* y se centrifugaron durante 15 minutos a 15000 xg. El sobrenadante se almacenó a -80°C. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA).

### 3.7.2 Western-Blot

El Western Blot (WB) es una técnica de análisis proteico que se utiliza para la detección de proteínas concretas dentro de un extracto proteico. En esta técnica, se emplea la electroforesis en gel de acrilamida para separar las proteínas en función de su tamaño, posteriormente estas proteínas son transferidas a una membrana de PVDF para hacer posible su incubación con el anticuerpo específico frente a la proteína que se desea detectar. Para nuestros análisis se partió de 40 µg de proteína total que se mezclaron con Laemmli Buffer 4X (Bio-Rad Laboratories, USA), se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se cargaron en un gel de SDS-Acrilamida al 10%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Bioscience, UK) durante 1 hora y 45 minutos.

**Tabla 7: Anticuerpos utilizados en el estudio.**

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Casa Comercial
Androgen Receptor	ab133273	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
TIMP-1	R&D AF970	1:150	R&D Systems, MN, USA
Actina	ab3280	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Mouse HRP	SC2005	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Goat HRP	SC2354	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Rabbit HRP	#31460	1:2000	Invitrogen, OR, USA
CK AE1/AE3	IR053	RTU	Agilent Technologies-DAKO, CA, USA
AKT	40D4	1:1000	Cell Signaling, MA, USA
pAKT	4060S	1:1000	Cell Signaling, MA, USA
PI3K	4292	1:1000	Cell Signaling, MA, USA
pPI3K	4228S	1:1000	Cell Signaling, MA, USA

Las membranas se bloquearon con BSA 5% en TBS-Tween 0,05% (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución adecuada para cada anticuerpo (Tabla 7), durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 15 minutos a TA y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 7). Tras un nuevo proceso de lavado, la señal se detectó utilizando el kit Immobilon Western Blotting (Millipore, Billerica,

MA, USA) mediante el uso de películas radiográficas y un revelador automático Curix 60 (Agfa-Gevaert, BE).

### **3.8 ENSAYOS FUNCIONALES**

#### **3.8.1 Ensayos funcionales *in vitro***

##### **3.8.1.1 Ensayo de migración en *transwell***

La migración celular es un proceso clave durante el proceso de curación de heridas y durante el proceso de diferenciación celular y desarrollo embrionario. Por otra parte, también es clave durante el proceso de metástasis tumoral. Para evaluar la capacidad migratoria de las líneas celulares MDA-MB 231 y SKOV-3, se llevaron a cabo ensayos utilizando *transwell* con membrana de policarbonato, con un tamaño de poro de 8.0  $\mu\text{m}$  (Corning, NY, USA), en placas de 24 pocillos. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo sin suero en los *transwell*. Los pocillos de la placa fueron rellenados con 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo completo con 20% de FBS como agente quimioatrayente. Tras una incubación de 24h, el *transwell* se colocó en un pocillo con 500  $\mu\text{l}$  de tripsina para despegar las células que habían atravesado la membrana. Estas células se marcaron utilizando Acetometil Ester de Calceína (4  $\mu\text{M}$ ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En las células vivas la calceína es hidrolizada por esterasas intracelulares dando lugar al anión calceína fluorescente que queda retenido en el citoplasma celular. La fluorescencia emitida por las células se midió a 485 nm usando un fluorímetro FLUOstar Optima (BMG labtech, DE) en placas de 96 pocillos.

En los casos en los que se utilizó este ensayo para testar la acción de algún tratamiento, este se incorporó tanto al medio sin FBS como al medio con 20% de FBS, con el fin de que el gradiente sólo estuviese generado por la diferencia de concentración de FBS.

### **3.8.1.2 Ensayo de proliferación en placa**

Con el fin de evaluar la capacidad proliferativa de las líneas celulares MDA-MB 231 y SKOV-3, se llevaron a cabo ensayos en placas de 96 pocillos. Se sembraron  $10^4$  células por pocillo en 200  $\mu$ l de medio de cultivo completo con 10% de FBS. Una vez las células se adhirieron a la placa (4 horas) se midió el tiempo 0. Para ello se retiró el medio de cultivo y se añadió medio con Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una dilución 1:10, se incubó durante 3 horas a 37°C y se midió la fluorescencia utilizando un fluorímetro a 544 nm. Posteriormente se midió otra placa a tiempo 72 horas, para poder establecer porcentaje de proliferación.

El Alamar Blue contiene Resazurina, un indicador redox que sufre un cambio de color en respuesta a su reducción mediante el metabolismo celular. Su forma reducida es rosa y muy fluorescente. Esta intensidad de fluorescencia es proporcional al número de células viables presentes en cada pocillo.

En los casos en los que se utilizó este ensayo para testar la acción de la abiraterona, la enzalutamida, el carboplatino y el paclitaxel respectivamente, éste se incorporó al medio a la concentración adecuada, una vez las células se adhirieron a la placa.

### **3.8.1.3 Ensayo de adhesión celular en placa**

Con el fin de evaluar la capacidad de adhesión de las líneas celulares MDA-MB 231, SKOV3 y sus respectivos silenciamientos, se llevaron a cabo ensayos utilizando placas de 96 pocillos recubiertos con colágeno (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ l de medio de cultivo en cada pocillo, marcadas con Acetometil Ester de Calceína (4  $\mu$ M; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras una incubación de 1 hora o 45 minutos, se lavaron con PBS (x3) aquellas células no adheridas. La fluorescencia emitida por las células adheridas se midió a 485 nm usando un fluorímetro FLUOstar Optima (BMG labtech,

DE) y se relativizó a una medida tomada a tiempo cero, para poder determinar el porcentaje de células adheridas.

#### **3.8.1.4 Ensayo de toxicidad con Carboplatino y Paclitaxel**

Con el fin de evaluar si existían diferencias en cuanto al efecto del Carboplatino (Accord Healthcare, Inc.) y el Paclitaxel (Accord Healthcare, Inc.) sobre las células MDA-MB 231 parentales y sus respectivos silenciamientos, se llevó a cabo un ensayo de toxicidad en placas de 96 pocillos empleando concentraciones crecientes de ambos compuestos.

Se sembraron  $3 \times 10^3$  células por pocillo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo con 10% de FBS. Una vez las células se adhirieron a la placa se incorporaron los compuestos al medio a la concentración adecuada. Al cabo de 5 días se retiró el medio de cultivo y se añadió medio con Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una dilución 1:10, se incubó durante 3 horas a 37°C y se midió la fluorescencia utilizando un fluorímetro FLUOstar Optima (BMG labtech, DE) a 544 nm, pudiendo de este modo calcular los porcentajes de inhibición respecto a los controles sin tratar en cada una de las condiciones.

#### **3.8.1.5 Ensayo de formación de colonias en agar**

Con el fin de evaluar la capacidad de formación de colonias de las líneas celulares MDA-MB 231 y SKOV-3 se llevaron a cabo ensayos con agarosa (Promega, Madison, WI, USA), en placas de 96 pocillos. Se recubrió el fondo de los pocillos con 70  $\mu$ l de medio de cultivo completo con 10% de FBS, suplementado con agarosa a una concentración final del 0,6%. Una vez solidificado, se sembraron encima  $3 \times 10^3$  células por pocillo, contenidas en 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo con 10% de FBS, suplementado con agarosa a una concentración final del 0,3%. Se esperó a que solidificase esta segunda capa y se añadieron 30  $\mu$ l de medio de cultivo completo con 10% de FBS por encima.

Se hizo una medida a tiempo 0 y otra medida a las 96 horas pudiendo de este modo determinar la formación de colonias que tuvo lugar durante este intervalo de tiempo. La medida se hizo mediante el método del Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que fue añadido en cada pocillo a una concentración final del 10%. Tras 3 horas de incubación a 37°C la medida se llevó a cabo con el fluorímetro FLUOstar Optima (BMG labtech, DE) a 544 nm.

En los casos en los que se utilizó este ensayo para testar la acción de algún tratamiento, este se incorporó en las distintas capas a la concentración adecuada.

### **3.8.2 Ensayos funcionales *in vivo***

#### **3.8.2.1 Ensayos con pez cebra**

##### **3.8.2.1.1 Cuidado y cruce de pez cebra**

Todos los ensayos con modelos de pez cebra se realizaron en colaboración con el grupo de Aquigen de Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. Los embriones de pez cebra fueron obtenidos cruzando peces cebra adultos (*Danio rerio*, fenotipo salvaje), los cuales se mantuvieron en tanques de 30L de capacidad con una ratio aproximado de 1 pez / L de agua, un ciclo luz/oscuridad de 14:10 horas y una temperatura de 28,5°C. Los embriones de pez cebra fueron obtenidos juntando adultos en una proporción de 2 hembras por cada macho. Todos los procedimientos usados en los experimentos, cuidado de los peces y tratamiento fueron realizados en concordancia con el Comité sobre el uso y cuidado de animales de la Universidad de Santiago de Compostela y los protocolos estándar de España (Directiva 2012-63-DaUE). En el punto final de los experimentos, los embriones de pez cebra fueron eutanasiados con sobredosis de triclaína.

### **3.8.2.1.2 Estudios de toxicidad en pez cebra**

Para determinar las dosis tóxicas para los peces cebra de abiraterona y enzalutamida se realizaron estudios de toxicidad. Los estudios de toxicidad fueron realizados en embriones de pez cebra por duplicado probando diferentes concentraciones de los compuestos. Este procedimiento consiste en exponer a los embriones de una edad de 0 horas post fecundación (hpf) a los compuestos disueltos en agua hasta las 96 hpf a una temperatura de incubación de 28,5°C para el óptimo desarrollo de los embriones. Las concentraciones usadas para ambos compuestos fueron 1, 5, 10, 20, 30  $\mu\text{M}$ . El control se realizó con DMSO al 2,5% ya que éste fue el vehículo en el que se disolvieron los compuestos. La n de peces para cada grupo experimental fue 12. Durante el periodo de incubación se cuantificó la mortalidad de los embriones en cada una de las condiciones cada 24h.

### **3.8.2.1.3 Ensayos con *xenograft* en pez cebra**

Los embriones de pez cebra fueron recogidos e incubados a 28,5°C durante las primeras 48 hpf. Posteriormente fueron anestesiados con 0.003% de tricaina (Sigma, St. Louis, MO, USA). La línea de CMTN MDA-MB 231 PLKO y la línea de cáncer de ovario SKOV-3 PLKO, así como sus respectivos silenciamientos y la MDA-MB 231-GFP, fueron incubados a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> antes de la inyección hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 70%.

Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, concentradas en un 1 millón de células en cada condición, teñidas con el marcador lipofílico de membrana DiI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) acorde al protocolo del fabricante (en los casos en los cuales las células no expresaban GFP) y de nuevo concentradas en 10 $\mu\text{L}$  de PBS con 2% de PVP40 (Polivinilpirrolidona) para evitar la agregación celular. Para la inyección de las células se utilizaron agujas con capilar de cristal de borosilicato (1 mm O.D. x 0.75 mm I.D.; World Precision Instruments). Se inyectaron aproximadamente entre 200 y 300 células

en la circulación (Ducto de Cuvier) de cada embrión usando un microinyector (IM-31 Electric Microinjector, Narishige) con una presión de salida de 34kPA y 30ms de salida de inyección. Después de la inyección, los embriones se incubaron durante 6 días post inyección (dpi) a 34°C en placas Petri de 30mL con agua de ósmosis autoclavada. En los casos en los que se utilizó este ensayo para testar la acción de la abiraterona y la enzalutamida, éstos se incorporaron 24 horas después de la inyección de las células en el agua a una concentración 1  $\mu$ M, previamente calculada mediante un ensayo de toxicidad como tolerada por los peces.

Los grupos experimentales que se utilizaron en el ensayo fueron los siguientes:

Ensayo de proliferación MDA-MB 231 shTIMP1: ( $n_{\text{réplica}}= 15$  peces por grupo;  $n_{\text{total}}= 45$  peces por grupo):

Grupo 1: Inyectados con células MDA-MB 231 PLKO (Control).

Grupo 2: Inyectados con células MDA-MB 231 shTIMP1\_2.

Grupo 3: Inyectados con células MDA-MB 231 shTIMP1\_4.

Ensayo de proliferación SKOV-3 shTIMP1: ( $n_{\text{réplica}}= 15$  peces por grupo;  $n_{\text{total}}= 45$  peces por grupo):

Grupo 1: Inyectados con células SKOV-3 PLKO (Control).

Grupo 2: Inyectados con células SKOV-3 shTIMP1\_3.

Grupo 3: Inyectados con células SKOV-3 shTIMP1\_4.

Ensayo del efecto de los inhibidores de la vía androgénica en células MDA-MB 231: ( $n_{\text{réplica}}= 15$  peces por grupo;  $n_{\text{total}}= 45$  peces por grupo):

Grupo 1: Inyectados con células. MDA-MB 231 en presencia de tratamiento Control DMSO 0,1%.

Grupo 2: Inyectados con células. MDA-MB 231 en presencia de abiraterona a una concentración 1  $\mu$ M.

Grupo 3: Inyectados con células MDA-MB 231 en presencia de enzalutamida a una concentración 1  $\mu$ M.

#### **3.8.2.1.4 Análisis de imagen de los embriones inyectados**

Las fotografías de los embriones fueron realizadas con un estereomicroscopio de fluorescencia Az-100 (Nikon) a los 1 dpi, 4dpi y 6dpi con el objetivo de seguir las células inyectadas en cada una de sus condiciones en la circulación del pez cebra.

El análisis de las imágenes se realizó mediante el software Quantifish para poder obtener la ratio de proliferación celular en la región de la cola o CHT del embrión de pez cebra mediante el área y la intensidad de la fluorescencia emitida por las células. El software analiza las imágenes en términos de fluorescencia, obteniendo un valor llamado densidad integrada, la cual está compuesta tanto por el área o número positivo de píxeles de la imagen por encima de un umbral establecido por el investigador, y la intensidad de dicha fluorescencia. Una vez obtenemos dicho valor, se procesa para obtener la ratio de proliferación deseado.

#### **3.8.2.2 Ensayos de *xenograft* en modelos murinos**

Los ratones empleados (nunca utilizados para otros ensayos ni tratados de ninguna forma) en este estudio fueron estabulados y mantenidos bajo condiciones específicas de ausencia de patógenos y siguiendo la guía institucional aprobada por el comité para el empleo y cuidado de animales, en las instalaciones SPF del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela (ES150780275701). Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela (15010/2015/001) y fueron diseñados y realizados por personal investigador en posesión de las acreditaciones correspondientes marcadas por las directrices de la

Federación de Asociaciones Europeas para la Ciencia del Animal de Laboratorio (FELASA) y recogidas en la normativa vigente.

En este estudio se emplearon ratones hembra SCID (PRBB, Barcelona) de 5 semanas. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno al 2% y las células MDA-MB 231 y su respectivo silenciamiento para TIMP-1 se inyectaron en la mama inferior derecha resuspendidas en 60  $\mu$ l de medio de cultivo suplementado con un 30% de Matrigel con factores (Corning, NY, USA).

Para su monitorización, llevada a cabo de forma semanal, se inyectaron 100  $\mu$ l de glucosa marcada RediJect 2-DG-750 Probe Standard Kit (Paerkin Elmer) de forma intraperitoneal y pasadas 3 horas se procedió a la toma de imágenes mediante el uso del sistema IVIS (Xenogen Corporation) y el software Living Image software 4.2 (Xenogen Corporation). Antes del sacrificio, mediante dislocación cervical, se volvieron a tomar imágenes nuevamente, mediante el uso del sistema IVIS. Se recogieron los distintos tejidos, se fijaron en formol al 40% y se incluyeron en parafina. Posteriormente se llevó a cabo una tinción de hematoxilina-eosina para determinar la presencia de tejido tumoral y de metástasis utilizando Hematoxilina de Mayer durante 4 minutos y eosina al 0,2% durante 1 minuto. En los casos en los que fue necesario la confirmación de la presencia de células tumorales en alguno de los tejidos se llevó a cabo una inmunohistoquímica para la detección de CK AE1/AE3. Ambos procedimientos, tanto el de hematoxilina-eosina como el de inmunohistoquímica se llevaron a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Grupos experimentales: ( $n_{\text{réplica}} = 3$  ratones por grupo;  $n_{\text{total}} = 9$  ratones por grupo).

Grupo 1: Inyectados con células MDA-MB 231 PLKO (Control).

Grupo 2: Inyectados con células MDA-MB 231 shTIMP1\_2.

### 3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando los softwares SPSS 22 para Macintosh (IBM Software Group, Chicago, IL, USA), Excel 2011 para Macintosh (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism 6.0 para Macintosh (GraphPad Softwares Inc, San Diego, CA, USA) y GraphPad Prism 7.0 para Windows (GraphPad Softwares Inc, San Diego, CA, USA).

Las comparaciones de expresión de los marcadores analizados entre grupos de pacientes y controles, se realizaron mediante un test no paramétrico, debido al número bajo de muestras analizadas. El test estadístico utilizado fue el test de Mann-Whitney U para determinar la existencia de diferencias significativas.

Las comparaciones entre grupos en los ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” con ratones se realizaron mediante un test no paramétrico, debido al número bajo de muestras analizadas. El test estadístico utilizado fue el test de Mann-Whitney U para determinar la existencia de diferencias significativas.

Las comparaciones entre grupos en los ensayos “*in vivo*” con pez cebra se llevaron a cabo usando un análisis T-test para determinar la existencia de diferencias significativas. En un primer paso, se identificaron los Outliers de la serie de datos mediante la función ‘Identify Outliers’.

Para el análisis de exactitud y precisión diagnóstica de cada uno de los marcadores, se utilizaron curvas ROC (Receiver-Operating Characteristic), método que mejor se adapta para la evaluación de la sensibilidad y exactitud de biomarcadores.

Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante el método de Kaplan-Meier y mediante un modelo de regresión de Cox.

Los análisis de correlación para variables continuas se realizaron mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson mientras

que las correlaciones entre variables categóricas se analizaron mediante el test Chi-Cuadrado.

Se aceptó como significativa una probabilidad menor al 5% ( $p < 0.05$ ).





# **RESULTADOS**



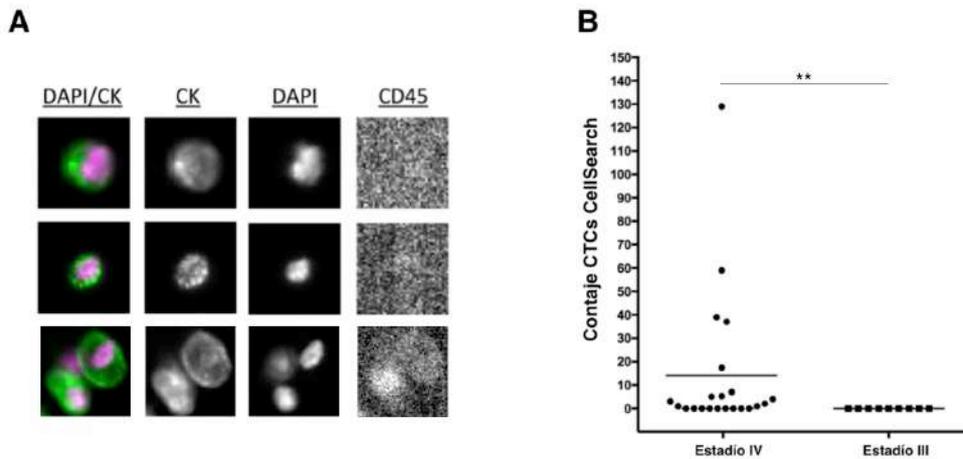
## 4-RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS CMTN

#### 4.1.1 VALOR CLÍNICO DEL CONTAJE DE CTCs EN PACIENTES CON CMTN

##### 4.1.1.1 Contaje de CTCs en pacientes con CMTN en estadios III y IV mediante la tecnología CellSearch

Mediante el uso de la tecnología CellSearch se llevó a cabo el contaje de CTCs contenidas en 7,5 ml de sangre periférica de las 32 pacientes con CMTN en estadios III y IV. Con esta tecnología se aísla y cuantifica la población tumoral circulante con fenotipo epitelial. Se aíslan las CTCs EpCAM positivas y se tienen en cuenta para la enumeración solamente aquellas con positividad para el cóctel de CKs 9/18/19 y negatividad para CD45. Del total de las pacientes un **42%** (14) presentaron al menos 1 CTC con un rango de entre 1 y 130 células, siendo todas ellas **estadio IV** (Figura 13). Es importante destacar que en tres de las pacientes se detectó la presencia de entre 1 y 3 *clusters* de CTCs, formados por entre 2 y 4 células (Figura 13).



**Figura 13:** Análisis de la población de CTCs en pacientes con CMTN mediante la tecnología CellSearch. A, Ejemplo de CTCs analizadas mediante la tecnología CellSearch, con marcaje positivo para CKs y DAPI y negativo para CD45. B, Cuantificación de CTCs mediante la tecnología CellSearch en pacientes con CMTN en estadios III y IV. (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ).

Por otra parte, se tomaron muestras a progresión de 11 de las pacientes con la finalidad de ver como evolucionaba el número de CTCs y poder caracterizarlas molecularmente. En esta segunda toma de muestra se observó un aumento en el número de CTCs en el 55% (6) de las pacientes, siendo interesante comentar que en las pacientes con un primer conteo de CTCs igual o superior a 5 fueron en las que el aumento fue más acusado. Por otra parte, en el resto de las pacientes en las que se tomó muestra a progresión el número de CTCs se mantuvo igual que en la muestra basal y éste siempre fue menor a 5 CTCs. Es importante mencionar que en esta segunda toma de muestra una de las pacientes (M-CHUS20) presentó un número muy elevado de CTCs (969 CTCs en 7,5 ml de sangre). Esta alta carga tumoral circulante motivó que se intentase generar un CDx (del inglés *CTCs derived xenograft*) a partir de las CTCs aisladas de esta paciente. Para ello se inoculó la fracción de PBMCs de forma subcutánea en un ratón NUDE y a los tres meses se observó crecimiento tumoral. Este CDx, que constituye el primer *xenograft* de CTCs en pacientes con CMTN, se caracterizó molecularmente y permitió identificar las vías celulares

más relevantes en este tumor y nuevos potenciales marcadores pronóstico para tumores TN (Pereira-Veiga et al., 2018).

#### **4.1.1.2 Asociación entre el número de CTCs y variables clínicas**

El 86% (19) de las pacientes metastásicas presentaron positividad para CTCs y, a su vez, un 26% de ellas mostraron un conteo superior a 5 CTCs/7,5 ml de sangre. Por otra parte, las 5 pacientes a tratamiento a fecha de muestra, presentaron niveles de CTCs menores (media 10,5; 0-37 CTCs) que las 26 que no estaban a tratamiento a fecha de recogida de la misma (media 23; 0-130 CTCs). Con el resto de variables clínicas estudiadas como el subtipo histológico, el grado histológico, el estadio a fecha de toma de muestra, el nivel de Ki67, la cirugía previa, la localización metastásica y los tratamientos previos a la toma de muestra, no se determinó ningún tipo de asociación debido probablemente a la heterogeneidad del grupo de pacientes a estudio.

#### **4.1.1.3 Valor pronóstico del conteo de CTCs mediante el sistema CellSearch**

Por otra parte, también se observó que las 8 pacientes con un conteo de CTCs superior a 5 CTCs/7,5ml de sangre analizadas mediante la tecnología CellSearch presentaron un peor pronóstico tanto en términos de SG como de SLP, con valores estadísticamente significativos y unas diferencias en cuanto a supervivencia de 20 y 16 (meses, respectivamente (Figura 14) (Tabla 8).

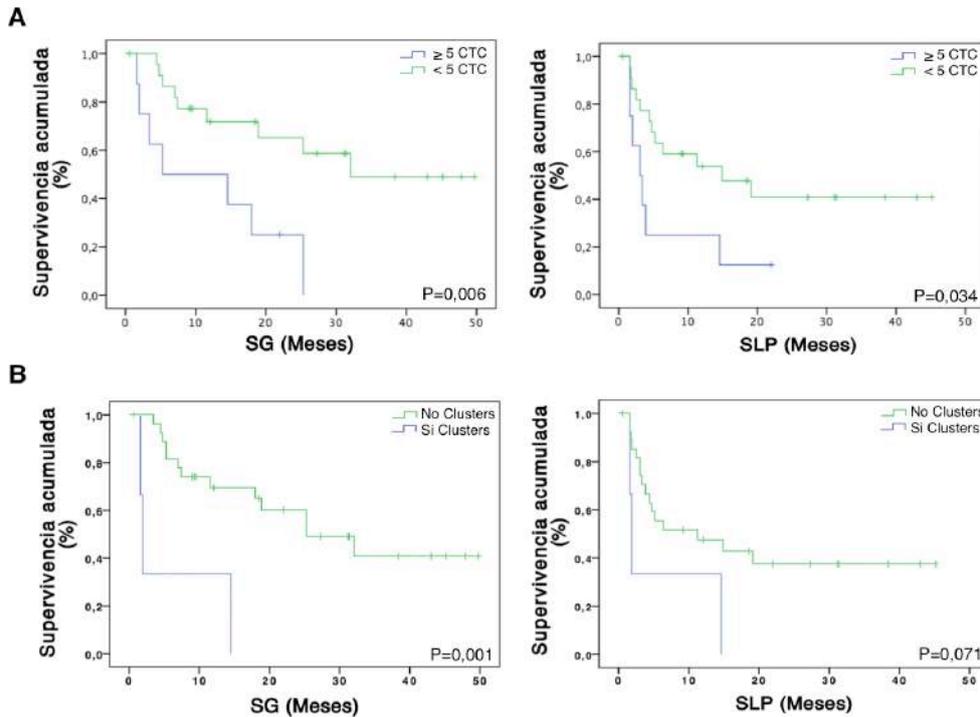


Figura 14: Análisis de supervivencia en función del conteo de CTCs mediante CellSearch. A, Curvas Kaplan-Meier para SG y SLP en función del conteo de CTCs (<5 vs  $\geq 5$  CTCs/7,5ml sangre). B, Curvas Kaplan-Meier para SG y SLP en función de la presencia o ausencia de *clusters* de CTCs. (Log Rank Test; \* $p < 0,05$ ).

A su vez se observó que aquellas pacientes en las que se detectaron *clusters* de CTCs mediante la tecnología CellSearch presentaban una SG significativamente menor que las pacientes sin *clusters*, con una diferencia en cuanto a la media de supervivencia de 23 meses. La SLP también fue mayor en las tres pacientes con *clusters* de CTCs, aunque sin alcanzar la significación estadística (Figura 14) (Tabla 8).

**Tabla 8: Análisis Kaplan-Meier para SG y SLP en función del contaje de CTCs mediante CellSearch.**

Macador	n	Supervivencia global (SG)		Supervivencia libre de progresión (SLP)	
		media (95% CI)	p	media (95% CI)	p
<b>CTC</b>					
<5	23	32,28 (23,77 - 40,80)	0,006	22,72 (14,27 - 31,16)	0,034
≥5	8	11,91 ( 4,79 - 19,03)		6,50 (1,59 - 11,41)	
<b>Clusters CTC</b>					
No	28	29,41 (21,75 - 37,08)	0,001	20,73 (13,15 - 28,31)	0,071
Si	3	6,04 (0 - 14,38)		6,04 (0 -14,38)	

Log Rank Test; \*p<0,05; \*\*p<0,01

En ambos casos se muestra también el análisis de regresión de Cox para cada uno de los marcadores evaluados, donde se observa que las pacientes con valores de CTCs iguales o superiores a 5CTCs/7,5 ml de sangre presentaron un riesgo de recurrencia 2,66 veces mayor y un riesgo de *exitus* 3,8 veces mayor. Por otra parte, este análisis mostró que las pacientes en las que se detectaron *clusters* de CTCs presentaron un riesgo de recurrencia 2 veces mayor y un riesgo de *exitus* 7 veces mayor (Tabla 9).

**Tabla 9: Análisis de regresión univariante de Cox para SG y SLP en función del contaje de CTCs mediante CellSearch.**

	Marcador	HR (95% IC)	p
SG	CTC (>5 vs. <5)	3,801 (1,359-10,634)	0,011
	Presencia <i>Clusters</i> (si vs. no)	7,104 (1,855-27,211)	0,004
SLP	CTC (>5 vs. <5)	2,66 (1,030-6,872)	0,043
	Presencia <i>Clusters</i> (si vs. no)	2,07 (1,01-4,476)	0,067

SG; S. global, SLP; S. libre de progresión, HR; Riesgo relativo, IC; Int.confianza

## **4.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CTCs DE PACIENTES CON CMTN**

### **4.1.2.1 Cuantificación y caracterización de CTCs en pacientes con CMTN mediante RT-q-PCR**

Teniendo en cuenta las limitaciones del sistema CellSearch a la hora de caracterizar y cuantificar la población de CTCs, en paralelo a este análisis se llevó a cabo un inmunoaislamiento manual utilizando el kit CellEction (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Con este protocolo se utilizan partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos que reconocen el antígeno de superficie EpCAM, pero en este caso la fracción enriquecida en CTCs se puede recuperar para caracterizar a nivel transcriptómico. Este análisis se llevó a cabo en el total de las 32 pacientes con CMTN incluidas en el estudio (estadios III y IV) y en 30 individuos sanos, que constituyeron nuestro grupo control. La presencia de una población circulante adicional en las pacientes se confirmó mediante el análisis de la expresión por RT-q-PCR de *GAPDH* y *PTPRC* (*CD45*). *GAPDH* es un gen de expresión constitutiva tomado como referencia, que se caracteriza por su expresión estable y que por lo tanto puede ser directamente correlacionado con la celularidad de la muestra. Los niveles de *GAPDH* en cada muestra incluyen tanto a las CTCs aisladas como a las células sanguíneas unidas inespecíficamente. Con el fin de eliminar este fondo inespecífico de cada muestra, se utilizó la expresión del marcador de células hematopoyéticas *CD45* como normalizador. Tal y como se observa en la Figura 15 los niveles de *GAPDH* en el grupo de pacientes fueron significativamente superiores al grupo de controles sanos, mientras que los niveles de *CD45* no presentaron diferencias significativas. Estos datos demuestran que se aisló una población extra a partir de la sangre de pacientes en comparación con los controles sanos y que, por otra parte, el nivel de inespecificidad en el aislamiento fue similar en ambos grupos.

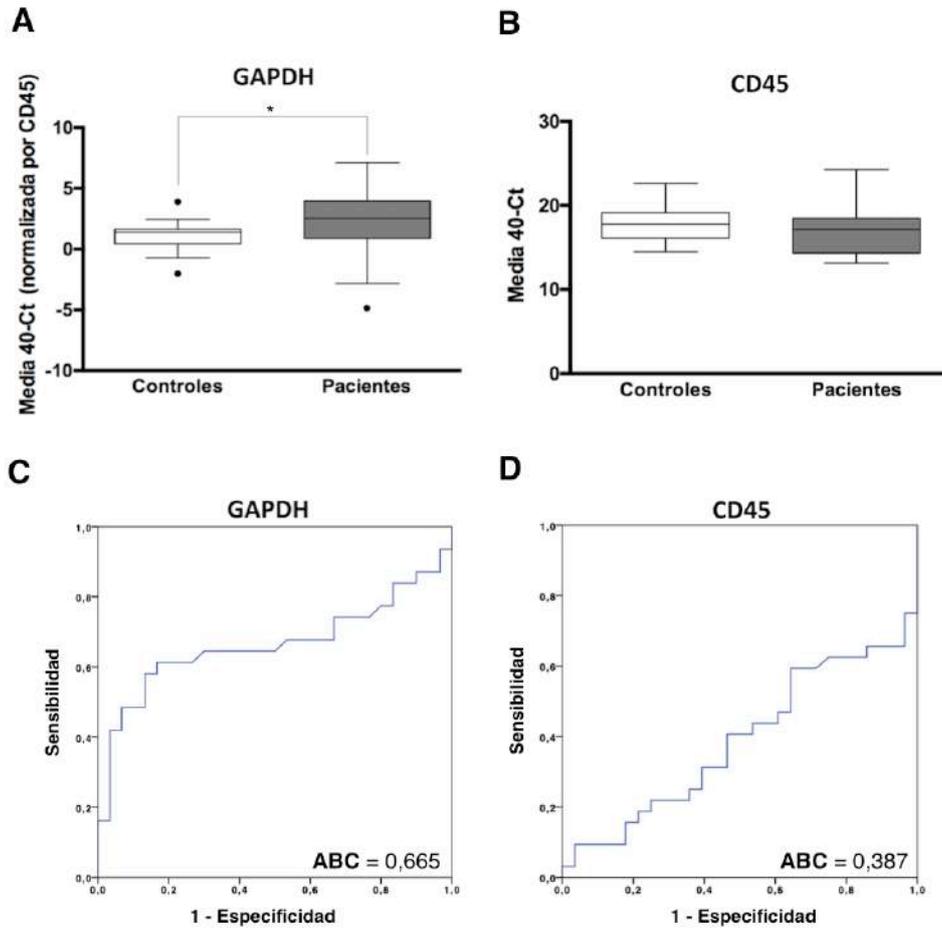


Figura 15: A y B, Niveles de expresión de *GAPDH* y *CD45* en la fracción inmunoaislada de pacientes y controles, analizados mediante RT-q-PCR (Test de Mann-Whitney, \*p<0,05). C y D, Valor diagnóstico de los niveles de expresión de *GAPDH* y *CD45* (curvas ROC) para discriminar controles y pacientes. ABC, área bajo la curva.

Asimismo, el análisis mediante curvas ROC confirmó la utilidad del análisis de los niveles de expresión de *GAPDH* para discernir entre controles y pacientes (AUC=0,665; p<0,027), mientras que la curva de *CD45* presenta un ajuste más cercano a la diagonal, confirmando la ausencia de diferencias entre controles y pacientes.

Una vez validada nuestra estrategia de análisis, se examinó el perfil expresión de un panel de genes relacionados con el proceso de EMT, con vías hormonales y con características de célula madre (*CDH1*, *EPCAM*, *VIM*, *ZEB1*, *ZEB2*, *LOXL2*, *SNAI1*, *FUT8*, *ANXA2*,

*TIMP1*, *CRIPTO1*, *AR*, *ALDH1*, *ALDH2*, *CD133*, *CD49F*, *CD44* y *BCL11A*), con el fin de identificar aquellos genes que caracterizan a las CTCs de pacientes con CMTN y que pueden estar jugando un papel importante en el proceso de diseminación tumoral.

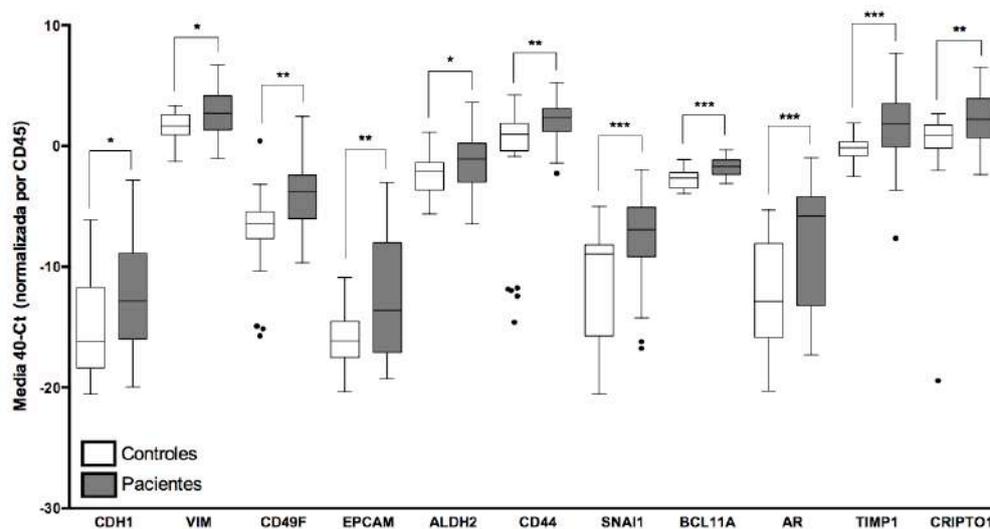
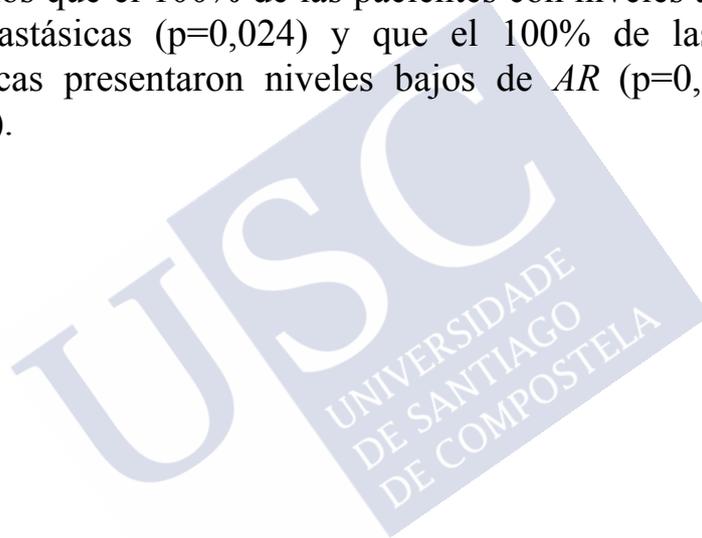


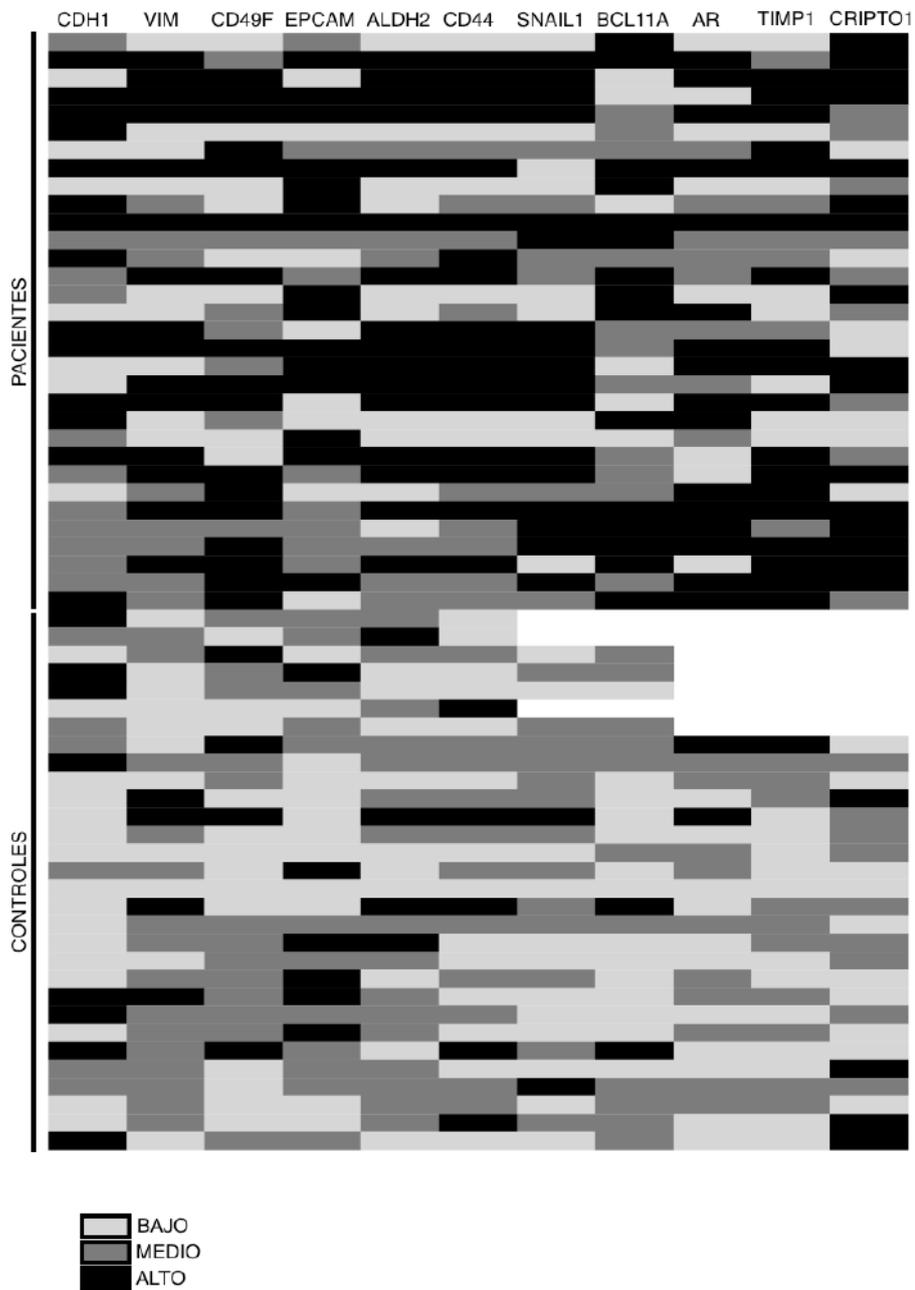
Figura 16: Perfil de expresión génica en la fracción de CTCs de pacientes con CMTN (en estadios III y IV) en comparación con la fracción inmunoaislada inespecíficamente en controles sanos. Grupo de controles (cajas blancas), grupo de pacientes (cajas grises) (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Entre los genes relacionados con **características epiteliales** se encontró un incremento significativo en los niveles de expresión de *CDH1* y *EPCAM* en las muestras de pacientes en comparación con controles sanos. Este resultado está en consonancia con la estrategia de aislamiento, basada en la presencia del marcador epitelial EpCAM. Por otro lado, con respecto a los **marcadores** relacionados con el proceso de **EMT**, es importante destacar que se encontró un incremento significativo en los niveles de expresión de *VIM*, *SNAI1*, *TIMP1* y *CRIPTO1*, todos marcadores que se han vinculado a la adquisición de características mesenquimales. Por otra parte, los marcadores asociados a fenotipo de **célula madre** *CD49F*, *ALDH2*, *CD44* y *BCL11A* también se encontraron aumentados en las muestras de la población de pacientes. Finalmente, también observamos niveles de expresión del *AR* significativamente incrementados en las muestras

de pacientes en comparación los controles sanos (Figuras 16 y 17). Estos resultados ponen de manifiesto la convivencia de marcadores epiteliales, mesenquimales y *stem*, por lo que podemos decir que la población tumoral circulante en pacientes con CMTN se caracteriza por presentar un fenotipo intermedio asociado a una importante plasticidad celular.

En cuanto a la asociación de los niveles de expresión de estos marcadores y las características clínicas de las pacientes, cabe destacar que cuando agrupamos los valores de los marcadores en altos/bajos (utilizando como punto de cohorte el percentil 70), observamos que el 100% de las pacientes con niveles altos de *CD49F* eran metastásicas ( $p=0,024$ ) y que el 100% de las pacientes no metastásicas presentaron niveles bajos de *AR* ( $p=0,035$ ) y *TIMP1* ( $p=0,014$ ).





**Figura 17:** *Heatmap* representativo del perfil de expresión génica identificado en CTCs de pacientes con CMTN en comparación con la fracción inmunoaislada inespecíficamente en controles sanos. El color gris claro representa valores que se encuentran por debajo del percentil 33, el gris oscuro valores que se encuentran entre los percentiles 33-66 y el negro valores que se encuentran por encima del percentil 66.

Para determinar como evolucionaron estos marcadores durante el proceso de diseminación, en 19 pacientes pudimos analizar el panel identificado en la población de CTCs en muestras de tejido sano y tumoral (tumor primario y/o metástasis) mediante RT-q-PCR. Tras el análisis se determinó un incremento significativo en los niveles de expresión de *EPCAM*, *SNAIL1*, *CD44*, *CDH1*, *TIMP1* y *BCL11A* en el tumor y las metástasis respecto al tejido sano o normal. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tejidos tumoral y metastásico para *AR*, *CD49F*, *ALDH2*, *CRIPTO1* y *VIM* (Figura 18). Por otra parte, se observó una alta correlación entre los valores de *CD49F* ( $p=0,022$ ) y *ALDH2* ( $p=0,032$ ) en las CTCs y en los tejidos procedentes de las lesiones metastásicas.

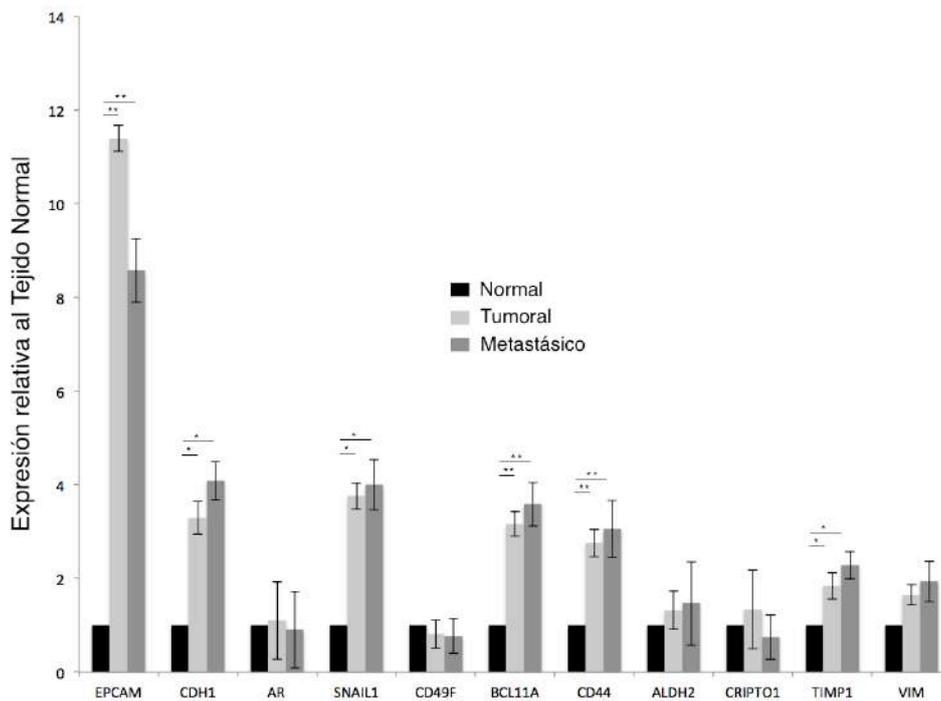


Figura 18: Perfil de expresión génica en tejido normal, tumoral y metastásico de pacientes con CMTN en estadios III y IV. Tejido normal (barras negras), tejido tumoral (barra gris claro), tejido metastásico (barra gris oscuro), (Test de Mann-Whitney; \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ).

#### **4.1.2.2 Estudio de correlación entre el número de CTCs obtenido con el sistema CellSearch y los niveles de los marcadores analizados mediante RT-q-PCR**

Por otra, parte se llevó a cabo un estudio de correlación entre los resultados obtenidos al analizar el perfil de marcadores de las CTCs y el conteo celular obtenido mediante la tecnología CellSearch. Este análisis confirmó que las pacientes en las cuales se detectaron niveles más altos ( $\geq 5$  CTCs) de CTCs por CellSearch, presentaron una mayor expresión de *CDH1* ( $p=0,015$ ), *EPCAM* ( $p=0,008$ ), *TIMP1* ( $p=0,023$ ) y *SNAI1* siendo esta última correlación no estadísticamente significativa. Estos datos de correlación entre niveles altos de CTCs y expresión de *EPCAM* concuerdan con el tipo de aislamiento EPCAM dependiente que se llevó a cabo.

#### **4.1.2.3 Valor diagnóstico del panel de marcadores identificado en la población de CTCs**

Con el fin de evaluar la capacidad de cada uno de los marcadores identificados en la población de CTCs para discriminar pacientes de controles se llevó a cabo un análisis con curvas ROC en el cual todos los marcadores presentaron un área bajo la curva mayor de 0,6 y un valor  $p$  significativo en todos los casos, a excepción de *ALDH2* (Tabla 10).

**Tabla 10: Resultados del estudio del poder diagnostico de los marcadores mediante curvas ROC**

<b>Marcador</b>	<b>ABC</b>	<b>Valor P</b>	<b>CI 95%</b>
<i>EpCAM</i>	0,697	0,013	0,560-0,834
<i>AR</i>	0,758	0,001	0,633-0,884
<i>TIMP1</i>	0,764	0,001	0,636-0,891
<i>CRIPTO1</i>	0,727	0,004	0,595-0,858
<i>CDH1</i>	0,712	0,008	0,571-0,853
<i>VIM</i>	0,659	0,046	0,515-0,803
<i>CD49F</i>	0,755	0,001	0,624-0,887
<i>ALDH2</i>	0,648	0,063	0,502-0,795
<i>CD44</i>	0,696	0,014	0,554-0,837
<i>SNAIL1</i>	0,793	<0,001	0,673-0,912
<i>BCL11A</i>	0,766	0,001	0,637-0,894
<i>GAPDH</i>	0,665	0,027	0,520-0,811
ABC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza			

Por otra parte, analizando todos los marcadores se consiguió generar un modelo de regresión logística combinando con solo tres de ellos (*TIMP1*, *SNAIL1* y *BCL11A*) que mejora la capacidad diagnóstica de los marcadores por separado, permitiendo clasificar como positivas para CTCs a un 60% de las pacientes (Figura 19).

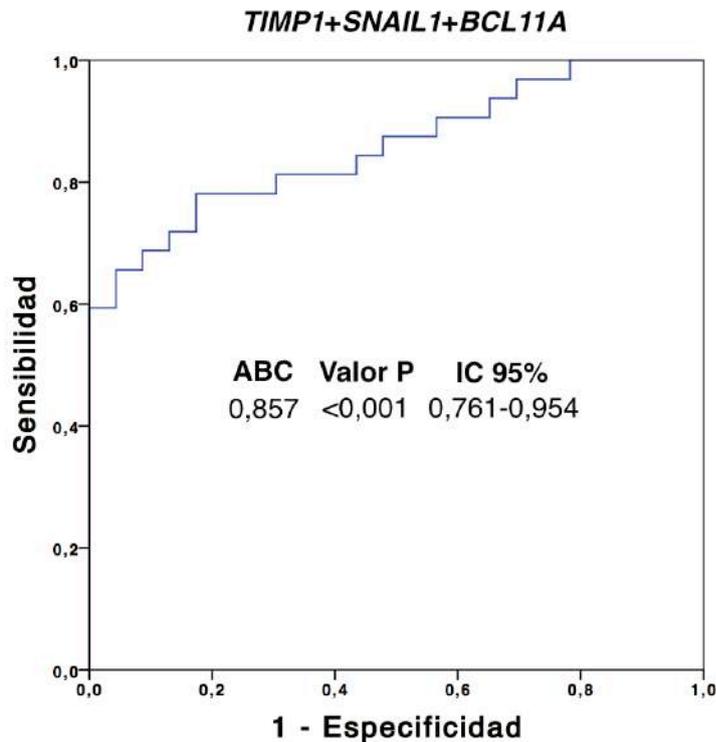
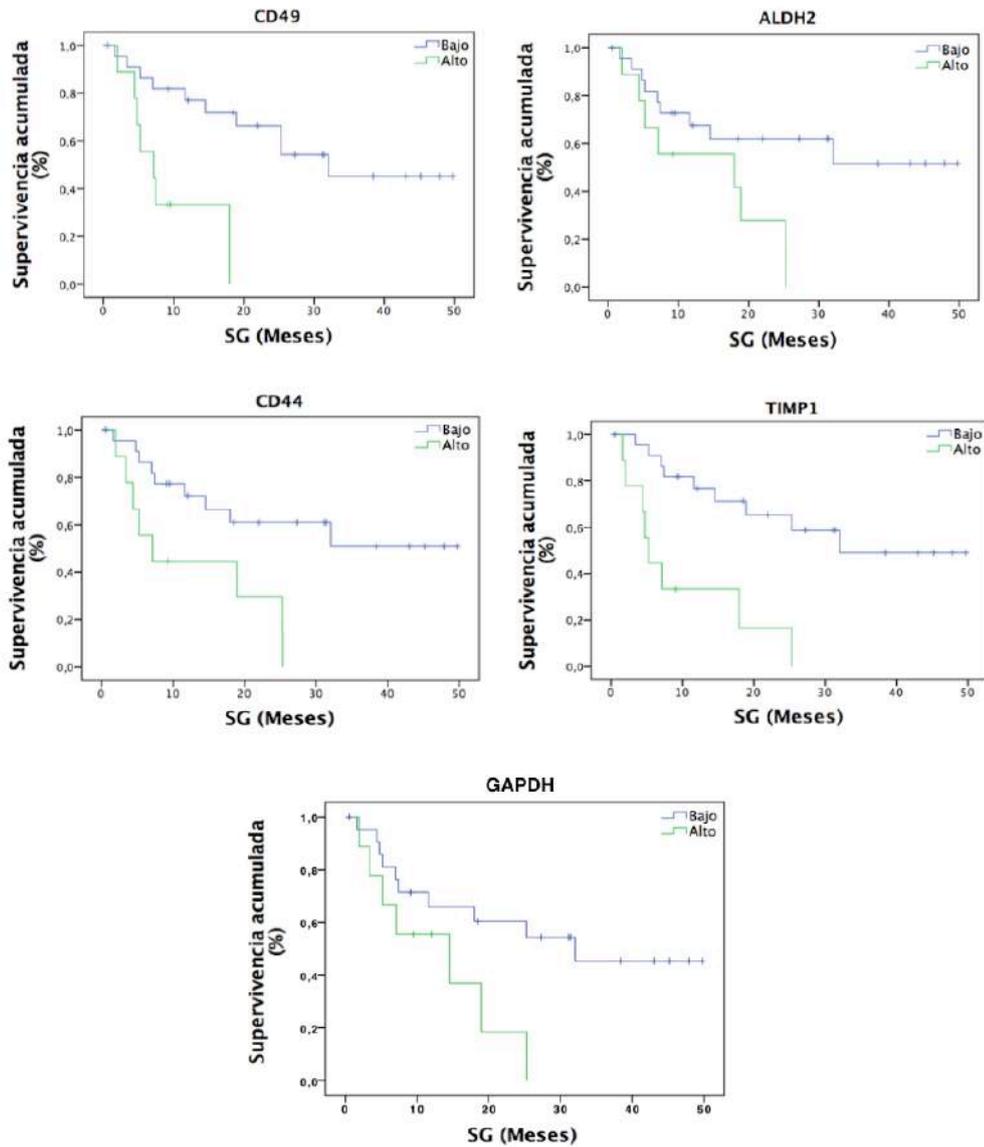


Figura 19: Modelo ROC de regresión logística combinando los marcadores *TIMP1*, *SNAIL1* y *BCL11A*.

#### 4.1.2.4 Valor pronóstico de los marcadores identificados en la población de CTCs

Con el objetivo de determinar el valor pronóstico de los marcadores presentes en la población de CTCs de nuestra cohorte de pacientes con CMTN para predecir los tiempos de SG y SLP, se llevó a cabo un análisis de supervivencia Kaplan-Meier para todos los marcadores estudiados. Tras este análisis se observó que niveles de expresión elevados de todos los marcadores por separado, a excepción de *BCL11A*, se asociaron con peores tiempos de supervivencia, tanto SG como como SLP. En concreto, niveles elevados de *CD49F*, *ALDH2*, *CD44*, *GAPDH* y *TIMP1* presentaron una asociación estadísticamente significativa con el tiempo de SG (Tabla 11) (Figura 20), mientras que para predecir la SLP los marcadores con impacto

estadísticamente significativo fueron *CD49F*, *GAPDH* y *TIMP1* (Tabla 11) (Figura 21).



**Figura 20:** Curvas Kaplan-Meier para SG en función de los niveles de expresión (alto/bajo) de *CD49F*, *ALDH2*, *CD44*, *TIMP1* y *GAPDH*.

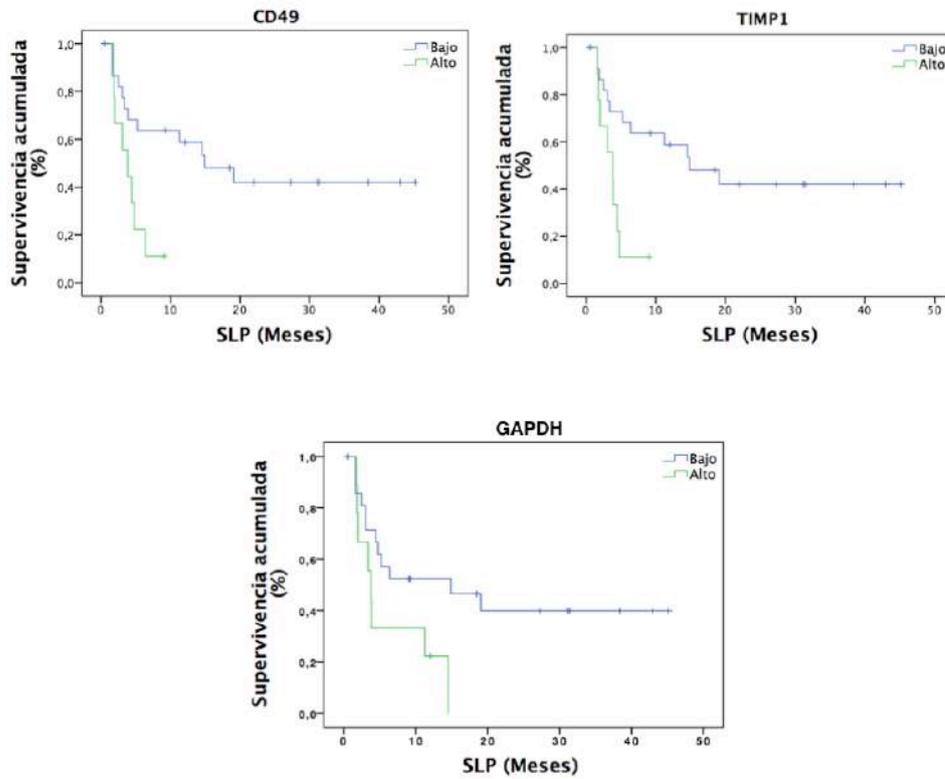


Figura 21: Curvas Kaplan-Meier para SLP en función de los niveles de expresión (alto/bajo) de *CD49F*, *TIMP1* y *GAPDH*.

Tabla 11: Resumen del análisis Kaplan-Meier de SG y SLP para los marcadores diferencialmente expresados entre controles y pacientes.

Macador	n	Supervivencia global (SG)		Supervivencia libre de progresión (SLP)	
		media (95% CI)	p	media (95% CI)	p
<b>CDH1</b>					
<p70	23	28,89 (20,44 - 37,35)	0,210	21,69 (13,34 - 30,05)	0,133
>p70	9	18,94 (6,33 - 31,55)		9,23 ( 2,40 - 16,06)	
<b>VIM</b>					
<p70	23	30,22 (21,46 - 38,99)	0,087	21,14 (12,84 - 29,44)	0,209
>p70	9	15,05 (8,29 - 21,80)		9,17 (1,94 - 16,40)	
<b>CD49F</b>					
<p70	23	31,57 (23,39 - 39,75)	0,002	23,30 (15,00 - 31,61)	0,011
>p70	9	9,42 (5,04 - 13,81)		4,12 (2,64 - 5,61)	
<b>EPCAM</b>					
<p70	23	30,40 (21,88 - 38,93)	0,057	20,26 ( 12,37 - 28,14)	0,220
>p70	9	15,19 (5,13 - 25,25)		12,11 (1,24 - 22,97)	
<b>ALDH2</b>					
<p70	23	31,70 (22,78 - 40,63)	0,017	22,77 (14,23 - 31,31)	0,072
>p70	9	14,23 (7,89 - 20,57)		7,16 (2,72 - 11,60)	
<b>CD44</b>					
<p70	23	32,12 (23,45 - 40,79)	0,006	22,75 ( 14,21 - 31,30)	0,077
>p70	9	12,75 (6,00 - 19,51)		7,19 (2,77 - 11,62)	
<b>SNAI1</b>					
<p70	23	30,34 (21,71 - 38,97)	0,074	21,28 (13,07 - 29,48)	0,148
>p70	9	15,50 (6,26 - 24,74)		9,44 (1,82 - 17,06)	
<b>BCL11A</b>					
<p70	23	23,50 ( 15,35 - 31,66)	0,500	17,63 (10,14 - 25,13)	0,953
>p70	9	30,39 (17,03 - 43,74)		19,53 (5,88 - 33,18)	
<b>AR</b>					
<p70	23	29,73 (21,53 - 37,92)	0,062	21,50 (13,34 - 29,65)	0,085
>p70	9	14,60 (6,32 - 22,88)		9,23 ( 1,45 - 17,01)	
<b>TIMP1</b>					
<p70	23	32,69 (24,38 - 40,99)	<0,001	23,43 (15,17 - 31,68)	0,005
>p70	9	10,00 (3,89 - 16,12)		3,81 ( 2,40 - 5,22)	
<b>CRIPTO1</b>					
<p70	23	28,19 (19,88 - 36,49)	0,273	19,53 (11,40 - 27,65)	0,607
>p70	9	16,12 (8,60 - 23,64)		10,02 ( 4,19 - 15,85)	
<b>GAPDH</b>					
<p70	23	30,04 (21,23 - 38,84)	0,046	21,79 (13,16 - 30,42)	0,046
>p70	9	12,85 (6,68 - 19,02)		6,34 ( 2,73 - 9,95)	

Log Rank Test; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

En el caso de los marcadores que son significativos en el análisis Kaplan-Meier se muestra también el análisis de regresión de Cox (Tabla 12) donde se observa que las pacientes con niveles altos de *CD49F*, *TIMP1* y *GAPDH* presentan respectivamente un riesgo de *exitus* 5 veces superior a las que tienen niveles bajos y las que tienen niveles altos de *ALDH2* y *CD44* presentan un riesgo de *exitus* 3 veces

superior a las que tienen niveles bajos. Por otra parte, las pacientes con niveles altos de *CD49F*, *TIMP1* y *GAPDH* presentan un riesgo de recurrencia entre 3 y 4 veces mayor que las pacientes con niveles bajos de dichos marcadores.

**Tabla 12: Resultado del análisis de regresión univariante de Cox para los marcadores con impacto pronóstico.**

	Marcador	HR (95% IC)	p
SG	<i>CD49F</i> (alto vs. bajo)	5,125 (1,617-16,25)	0,006
	<i>ALDH2</i> (alto vs. bajo)	3,122 (1,159-8,408)	0,024
	<i>CD44</i> (alto vs. bajo)	3,695 (1,371-9,958)	0,01
	<i>TIMP1</i> (alto vs. bajo)	5,126 (1,873-14,027)	0,001
	<i>GAPDH</i> (alto vs. bajo)	5,185 (1,498-15,298)	0,004
SLP	<i>CD49F</i> (alto vs. bajo)	3,33 (1,231-9,010)	0,018
	<i>TIMP1</i> (alto vs. bajo)	3,866 (1,397-10,701)	0,004
	<i>GAPDH</i> (alto vs. bajo)	3,563 (1,345-10,178)	0,014

SG; S. global, SLP; S. libre de progresión, HR; Riesgo relativo, IC; Int.confianza

#### 4.1.3 VALIDACIÓN DE LAS POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS IDENTIFICADAS EN CTCs DE PACIENTES CON CMTN

Una vez caracterizado el perfil de expresión de población de CTCs de pacientes con CMTN, e identificados marcadores con valor para predecir su pronóstico, seleccionamos dos genes, el *AR* y *TIMP1* para determinar si su modulación podía ser de utilidad clínica como estrategia terapéutica en tumores TN. Estos dos genes se seleccionaron porque fueron de los que mostraron una mayor diferencia entre controles y pacientes, asociándose niveles elevados de los dos con peores tasas de supervivencia, y porque representan dos dianas terapéuticas con interés para tratar el cáncer de mama. A continuación, se describen los resultados de los estudios moleculares y funcionales llevados a cabo bloqueando la acción de ambas moléculas en la línea tumoral de CMTN MDA-MB 231. Esta línea tumoral estable se generó a partir de líquido pleural de una paciente con un adenocarcinoma hormono independiente (ER<sup>-</sup> y PR<sup>-</sup>) y HER2<sup>-</sup> (Cailleau, Olivé, & Cruciger, 1978), siendo la línea epitelial más

utilizada como modelo de tumor TN en los laboratorios de investigación.

#### 4.1.3.1 Validación *in vitro* e *in vivo* del bloqueo de la vía mediada por el receptor de andrógenos como estrategia terapéutica en CMTN

Con el fin de bloquear la vía androgénica en nuestra línea celular modelo, la cual presenta positividad para la expresión del receptor de andrógenos tanto a nivel proteico (Figura 22 A) como a nivel transcripcional mediante RT-q-PCR, se utilizó tratamiento con dos fármacos que bloquean la vía a dos niveles diferentes. Uno de ellos fue la abiraterona, un potente inhibidor de la biosíntesis androgénica que actúa inhibiendo la acción de la enzima CYP17A1 esencial para la maduración de los precursores androgénicos. El otro fue la enzalutamida, un potente inhibidor del receptor androgénico que impide la unión de los andrógenos al receptor, inhibe su translocación nuclear, la unión del receptor de andrógenos al ADN y el reclutamiento de co-activadores transcripcionales, bloqueando la transcripción de los genes regulados por la vía androgénica (Antonarakis, 2013) (Figura 22 B).

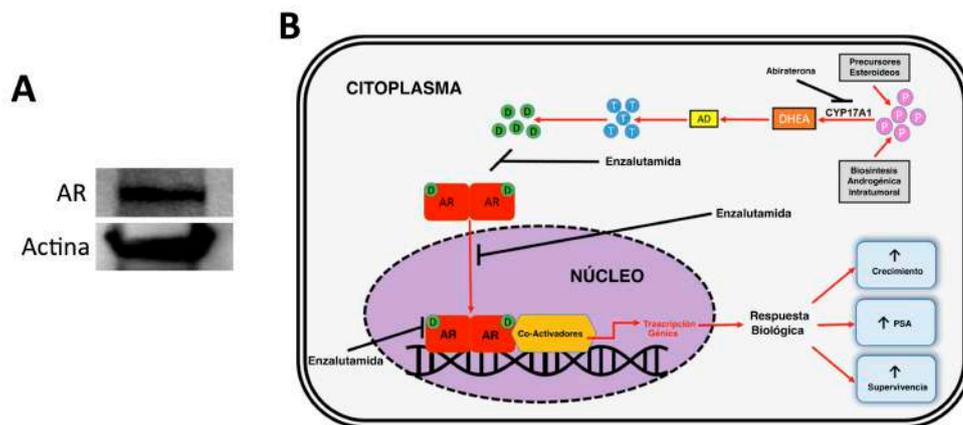


Figura 22: A, Niveles proteicos de AR analizados mediante Western Blot en la línea MDA-MB 231. B, Puntos de la vía androgénica en donde actúan la abiraterona y la enzalutamida. Adaptado de (Crona et al. 2017). DHEA, Dihidroepiandrosterona; AD, Androstenediona; T, Testosterona; D, Dihidrotestosterona.

#### **4.1.3.1.1 Impacto del bloqueo de la vía androgénica en la capacidad de proliferación, formación de colonias en agar y migración en la línea celular MDA-MB 231.**

Con el fin de evaluar la implicación de la vía androgénica en la proliferación de la línea celular MDA-MB 231 se llevaron a cabo ensayos de proliferación en placa con Alamar Blue mediante los cuales se observó que tras el bloqueo de la vía con abiraterona 10  $\mu\text{M}$  o enzalutamida 10  $\mu\text{M}$  (concentración máxima que no produce muerte celular, calculada mediante ensayo de toxicidad) la tasa proliferación relativa de la línea celular descendió un 32% y un 6% de media, respectivamente, en relación a la condición control (DMSO a 1% concentración) (Figura 23A). Este descenso fue estadísticamente significativo solamente en el caso del tratamiento con abiraterona.

Por otro lado, para determinar la implicación de la vía androgénica en la capacidad de formación de colonias en ausencia de sustrato de la línea celular MDA-MB 231 se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias en agar en los cuales se pudo observar un descenso en dicha clonogenicidad en las condiciones de tratamiento con abiraterona 10  $\mu\text{M}$  y enzalutamida 10  $\mu\text{M}$  del 42% y del 9%, respectivamente, en referencia a la condición control (Figura 23B). De nuevo, tal y como ocurrió en los ensayos de proliferación, este descenso solamente alcanzó la significación estadística en la condición de tratamiento con abiraterona.

Por último, para evaluar la implicación de la vía androgénica en la capacidad de migración de nuestra línea celular modelo se llevaron a cabo ensayos de migración en placa utilizando *Transwell*. Tras estos ensayos no se observaron diferencias en migración entre las líneas tratadas con abiraterona 10  $\mu\text{M}$  o enzalutamida 10  $\mu\text{M}$  y la condición control (Figura 23C).

Con estos resultados indican que el bloqueo de la actividad de AR con abiraterona en las MDA-MB 231 reduce la capacidad proliferativa en adhesión a sustrato y en condiciones de crecimiento

sin adhesión. Esto podría indicar que la inhibición de la síntesis de andrógenos es más eficiente que el bloqueo directo del receptor.

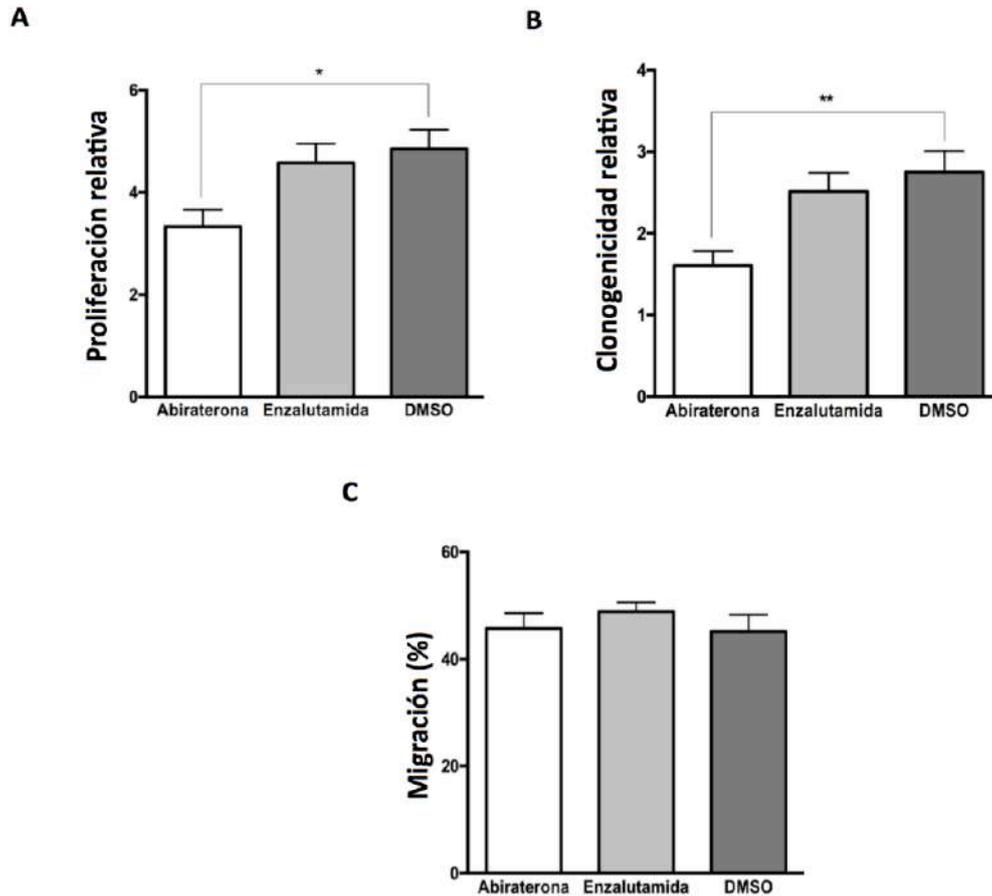


Figura 23: Estudios funcionales *in vitro* con la línea celular MDA-MB 231 en presencia de los inhibidores de la vía androgénica, abiraterona 10  $\mu$ M o enzalutamida 10  $\mu$ M. A, Ensayo de proliferación. B, Ensayo de formación de colonias en agar. C, Ensayo de migración en *transwell*. (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).  $n_{\text{replica}} = 6$  replicados,  $n_{\text{total}} = 5$  ensayos. El DMSO al 1% se utilizó como vehículo de los fármacos.

#### 4.1.3.1.2 Estudio *in vivo* del efecto del bloqueo de la vía androgénica en la línea celular MDA-MB 231

Con el fin de estudiar *in vivo* el efecto del bloqueo de la vía androgénica en la línea celular MDA-MB 231, se ha utilizado como modelo animal el pez cebra. Esta especie de vertebrado, tiene un mantenimiento sencillo, una fácil reproducción y además sus

embriones son transparentes lo que permite la visualización de las células transplantadas en el animal. Por otra parte, se pueden disolver compuestos en el agua con el fin de evaluar su eficacia frente a diferentes tipos celular inyectados en el pez.

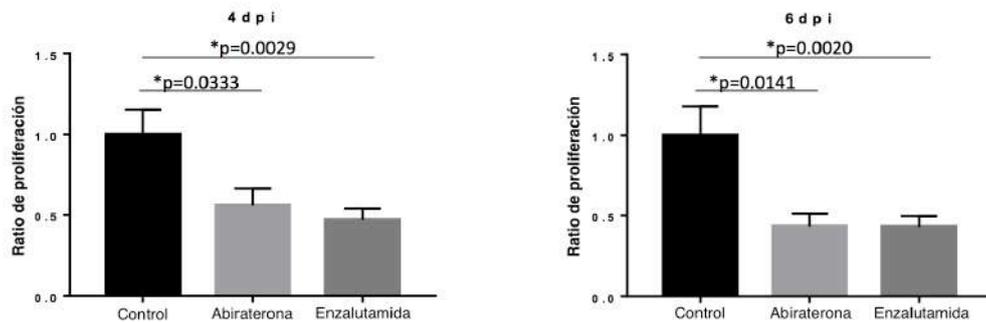
#### **4.1.3.1.3 Ensayo de toxicidad en respuesta a tratamiento con abiraterona y enzalutamida en pez cebra**

Con el fin de conocer la concentración mínima que causa mortalidad en los embriones de pez cebra, se llevó a cabo un ensayo de toxicidad con los dos fármacos. Tras realizar los test de toxicidad durante 96 hpf pudimos concluir que la concentración a utilizar sería de 1  $\mu\text{M}$ , puesto que tanto en la abiraterona como en la enzalutamida los efectos tóxicos se manifestaron a partir de las 24 hpf a concentración 10  $\mu\text{M}$  de ambos fármacos, sin tener en cuenta el efecto de la temperatura. Por otra parte, observamos que la enzalutamida es más tóxica que la abiraterona, siendo la mortalidad a 96 hpf del 83,34% en el grupo tratado con la enzalutamida y del 41,66% en el grupo tratado con la abiraterona, a la concentración de 30  $\mu\text{M}$ .

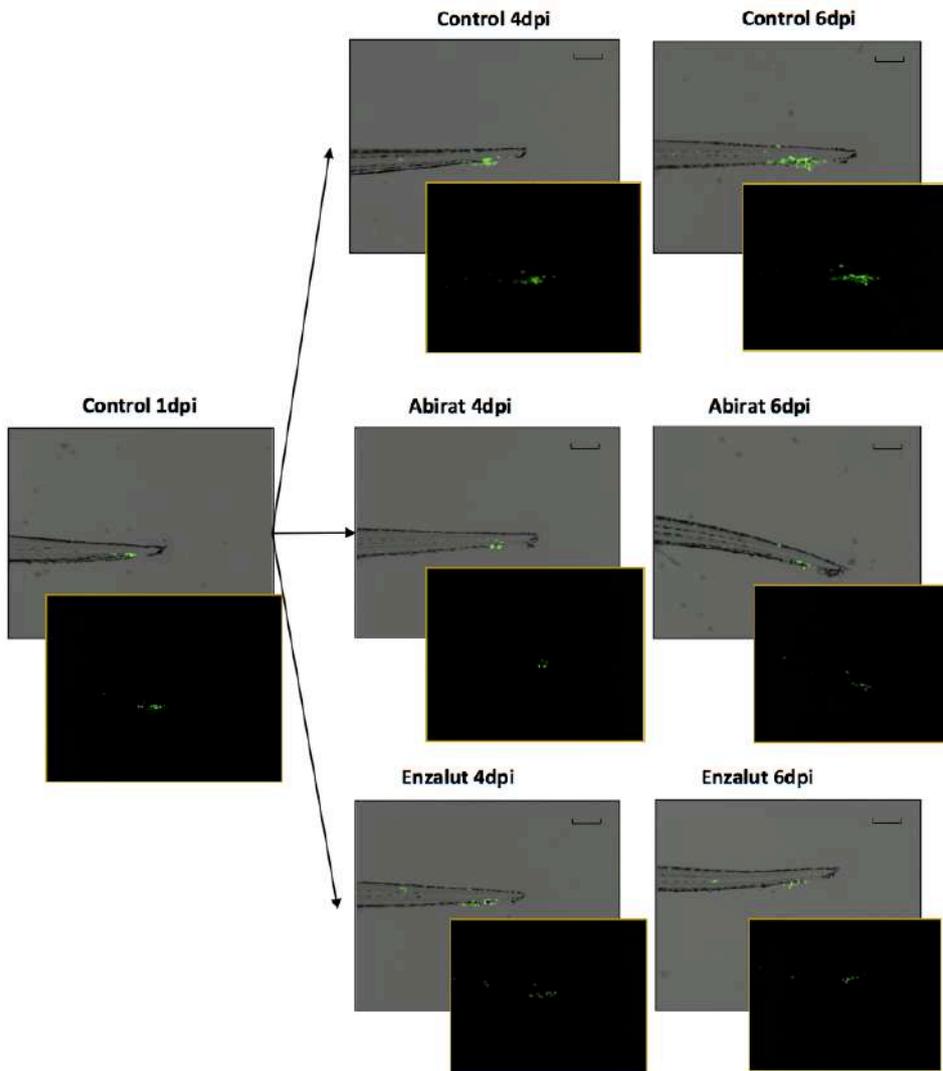
#### **4.1.3.1.4 Ensayo de proliferación y migración en pez cebra**

Los embriones de pez cebra fueron inyectados en circulación con la línea control MDA-MB 231-GFP, para poder analizar las diferencias de proliferación y capacidad de migración debidas a la presencia de los fármacos abiraterona y enzalutamida a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Las células MDA-MB 231-GFP fueron tripsinizadas, concentradas e inyectadas en la circulación (Ducto de Cuvier) de los embriones de pez cebra a las 48 hpf e incubados durante 6 días después de la inyección a 34°C para poder analizar la proliferación de las distintas condiciones en la región del tejido hematopoiético caudal del embrión de pez cebra. De esta manera los embriones fueron fotografiados a 1, 4 y 6 dpi con el objetivo de poder realizar una comparación entre las fotografías de fluorescencia entre los distintos días y condiciones.

Los resultados obtenidos indicaron que tanto la abiraterona como la enzalutamida causaban inhibición en la proliferación de las células inyectadas en comparación con el control tanto a 4 como a 6 dpi. Se observaron reducciones estadísticamente significativas del 44% en el tratamiento con abiraterona y 54% con enzalutamida a los 4 dpi, mientras que a los 6 dpi la reducción observada fue del 57% en ambos casos (Figuras 24 y 25).



**Figura 24: Proliferación de la línea celular MDA-MB 231 en los peces cebra en presencia de los inhibidores de la vía androgénica, abiraterona y enzalutamida (1  $\mu$ M). Crecimiento tumoral normalizado ( $n_{\text{replica}} = 15$  embriones/condición,  $n_{\text{total}} = 45$  embriones/condición; 4 dpi, 4 días post-inyección; 6 dpi, 6 días post-inyección T-Test; \* $p < 0.05$ ).**



**Figura 25: Proliferación *in vivo* en pez cebra con la línea celular de CMTN MDA-MB 231 en presencia de los inhibidores de la vía androgénica, abiraterona y enzalutamida (1  $\mu$ M), respectivamente. Imágenes representativas de los embriones inyectados en las diferentes condiciones comparando 4 dpi y 6 dpi. Escala 250  $\mu$ m.**

#### 4.1.3.2 Validación *in vitro* e *in vivo* de la inhibición de TIMP1 como estrategia terapéutica en CMTN

El gen *TIMP1* fue seleccionado para estudiar su valor como diana terapéutica en el contexto del CMTN tras la caracterización de la población de CTCs debido a su importante expresión diferencial entre controles y pacientes, por su valor pronóstico para predecir SG y SLP y también por la existencia de reciente bibliografía en la que se asocia niveles elevados de *TIMP1* con un peor pronóstico en tumores de mama (G. Cheng et al., 2016).

El silenciamiento del gen *TIMP1* en la línea celular MDA-MB 231 se llevó a cabo mediante tecnología shARN, utilizando partículas lentivirales portadoras de las secuencias de interferencia. Posteriormente las líneas celulares silenciadas fueron seleccionadas en presencia de Puromicina y nombradas como shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4, mientras que el control fue nombrado como PLKO.

Dicho silenciamiento fue confirmado mediante RT-q-PCR y mediante Western Blot (Figura 26).

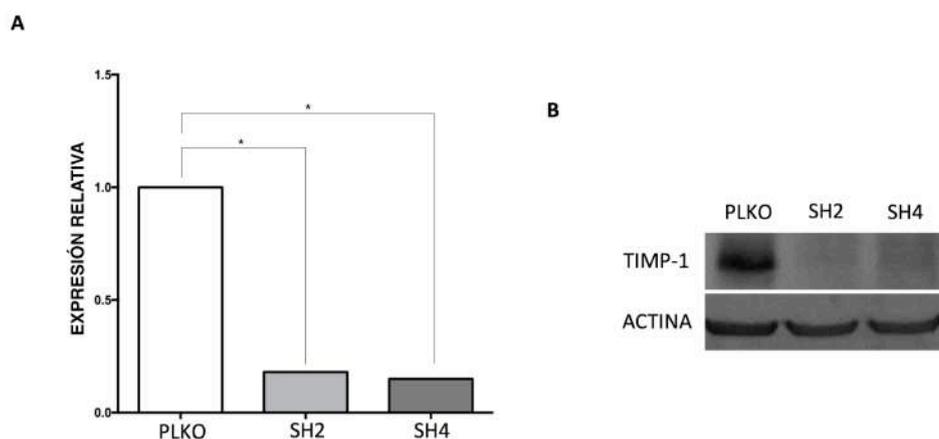


Figura 26: Análisis de los niveles de expresión del gen *TIMP1* en la línea celular de MDA-MB 231 tras el silenciamiento. A, Niveles de expresión de *TIMP1* analizados mediante RT-q-PCR en las líneas PLKO, shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4 (n=3). B, Niveles proteicos de TIMP1 analizados mediante Western Blot en las líneas PLKO, shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4 (n=3).

#### 4.1.3.2.1 Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en la expresión de marcadores de plasticidad celular en la línea MDA-MB 231

Tras el silenciamiento de *TIMP1*, se analizó mediante RT-q-PCR la expresión de distintos marcadores relacionados con el proceso de EMT (*CDH1*, *CDH12*, *CD133* y *VIM*) ya que en otros tumores se ha descrito que *TIMP1* promueve la progresión tumoral mediante la activación de EMT (R. C. D'Angelo et al., 2014; G. Song et al., 2016). Se observó un descenso en la expresión de *CDH12* y *CD133* y un aumento de la expresión de *CDH1* en las líneas silenciadas con respecto a la línea control. Por otra parte, no se observaron variaciones en la expresión de *VIM* (Figura 27). Estos datos sugieren que el silenciamiento de *TIMP1* promueve que la línea celular MDA-MB 231 adquiera un fenotipo más epitelial.

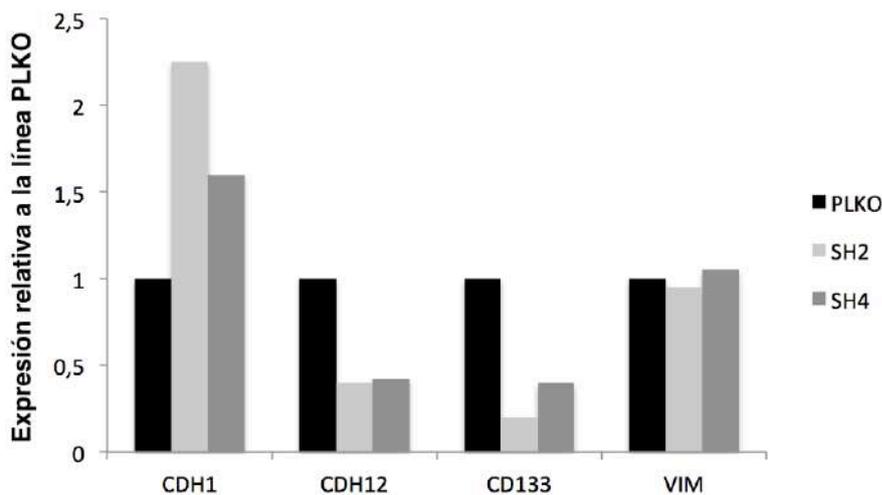


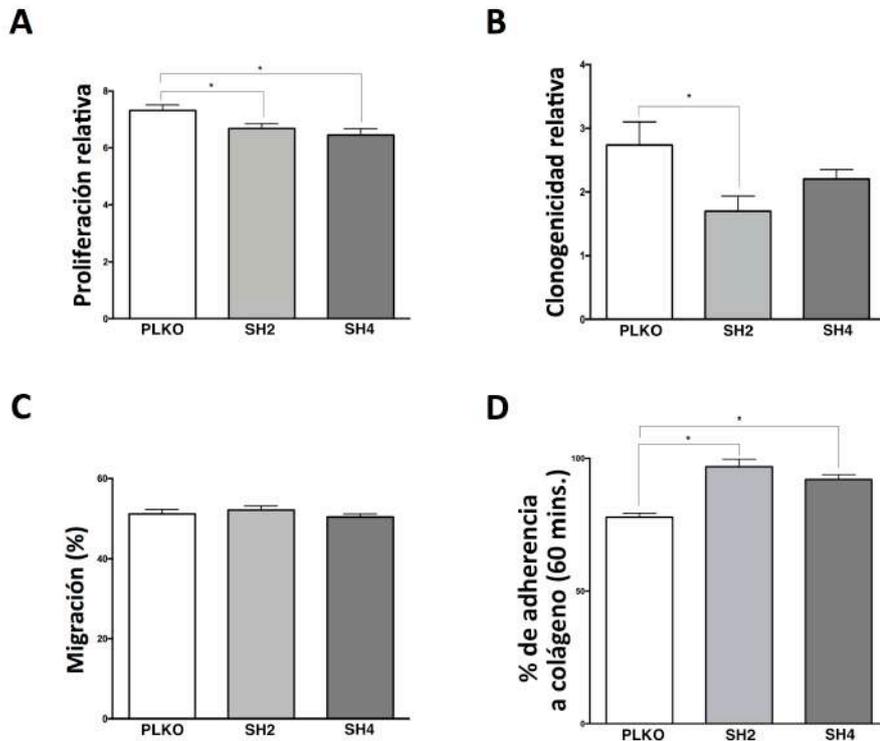
Figura 27: Análisis de los niveles de expresión de *CDH1*, *CDH12*, *CD133* y *VIM* analizados mediante RT-q-PCR en las líneas PLKO, shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4. (n=3).

#### 4.1.3.2.2 Efecto del silenciamiento de *TIMP1* en la capacidad de proliferación, clonogenicidad, invasión y adhesión de la línea MDA-MB 231

Con el fin de evaluar la implicación de *TIMP1* en la proliferación de la línea celular MDA-MB 231 se llevaron a cabo ensayos de proliferación en placa mediante los cuales se observó un

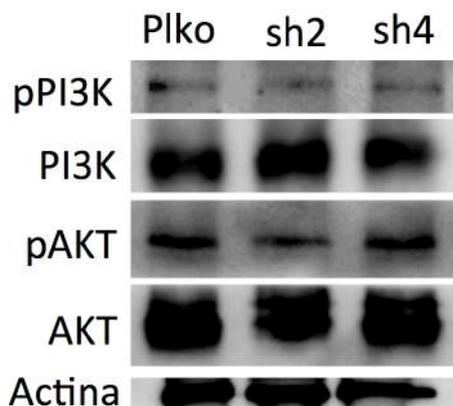
descenso estadísticamente significativo en la proliferación en las shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4 de un 9% y un 12%, respectivamente, mostrando que tras el silenciamiento la línea celular pierde capacidad proliferativa (Figura 28A). Asimismo, tras la realización de ensayos de formación de colonias en agar, se observó un descenso en la clonogenicidad en las shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4 de un 38% y un 20%, respectivamente, en relación a la línea control (Figura 28B). Sin embargo, este descenso solo fue estadísticamente significativo en la línea shTIMP1\_2.

Para evaluar la implicación de *TIMP1* en la capacidad de migración de la línea celular MDA-MB 231 se llevaron a cabo ensayos de migración en placa utilizando *transwell*, mediante los cuales no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de células que eran capaces de migrar a través de dicho *transwell* entre las líneas silenciadas y la línea control (Figura 28C). Finalmente, también se testó la capacidad de las líneas silenciadas para adherirse a la placa de cultivo tratada con colágeno, mostrando las líneas silenciadas mayor capacidad de adherirse a la matriz de colágeno (Figura 28D).



**Figura 28:** Ensayos funcionales *in vitro* con las líneas shTIMP1\_2, shTIMP1\_4 y PLKO. A, Ensayo de proliferación (Fluorescencia Alamar Blue). B, Ensayo de formación de colonias (Fluorescencia Alamar Blue). C, Ensayo de migración (Fluorescencia Calceína), D ensayo de adhesión a colágeno. (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ).  $n_{\text{replica}}$  (A, B, C) = 6 replicados,  $n_{\text{total}} = 5$  ensayos.  $n_{\text{replica}}$  (D) = 4 replicados,  $n_{\text{total}} = 3$  ensayos.

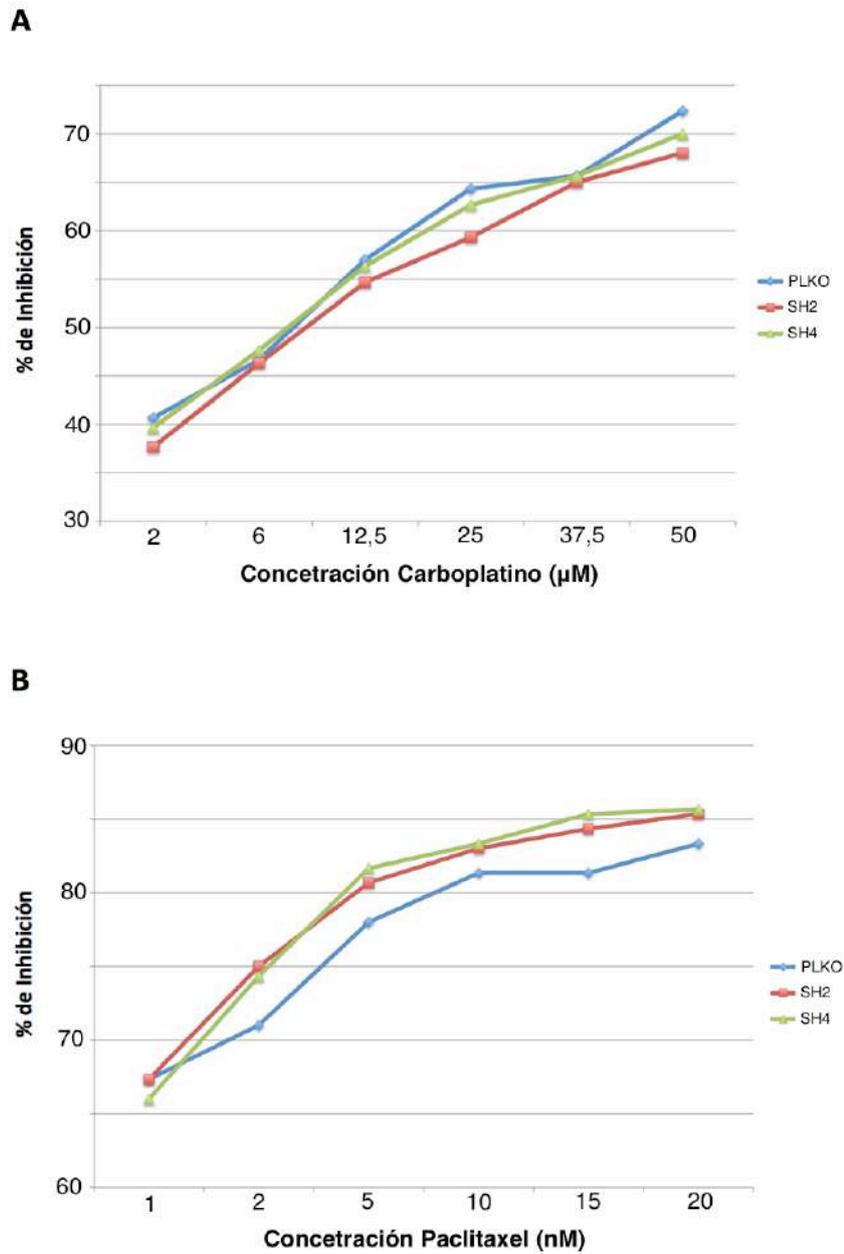
Está descrito en otros tipos de tumores (Forte et al., 2017; G. Song et al., 2016) que TIMP1 estimula la proliferación a través de la vía de PI3K/AKT. Por lo que quisimos evaluar si esta vía estaba siendo afectada por su silenciamiento en nuestro modelo celular mediante estudios de Western Blot. Tal y como se puede ver en la Figura 29 no se observaron diferencia de los niveles de activación de AKT o PI3K en ninguna de las líneas silenciadas respecto al control, por lo que la reducción de los niveles de proliferación tras el silenciamiento del inhibidor de metaloproteasas de matriz tiene que estar mediado por otras vías moleculares alternativas.



**Figura 29:** Análisis mediante Western Blot mostrando la expresión proteica de AKT total, pAKT, PI3K total y pPI3K.

#### **4.1.3.2.3 Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en la respuesta al tratamiento con Carboplatino o Paclitaxel.**

Con el fin de evaluar si la acción de TIMP1 puede tener alguna implicación en la respuesta a tratamientos habituales para tratar el CMTN como el Carboplatino o Paclitaxel se llevaron a cabo ensayos de proliferación en placa en presencia de dichos fármacos en concentraciones crecientes en las líneas silenciadas y control. Se observó, que tanto en el tratamiento con Carboplatino como en el tratamiento con Paclitaxel ambas líneas silenciadas y la línea control se vieron afectadas del mismo modo por los tratamientos quimioterápicos (Figura 30). Por lo que la actividad de este marcador no parece ser relevante para la respuesta a estos dos fármacos que tienen mayor efecto con tasas proliferativas altas ya que una de sus propiedades es bloquear la replicación del ADN.



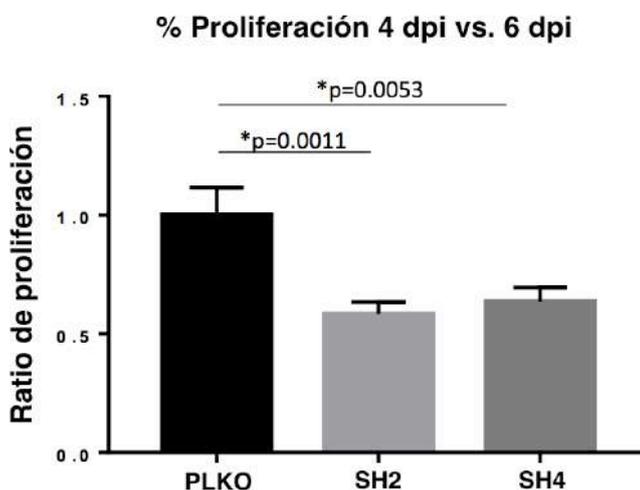
**Figura 30: Efecto del tratamiento con carboplatino (A) y paclitaxel (B) en las líneas shTIMP1\_2, shTIMP1\_4 y PLKO. Se representa el porcentaje de inhibición para cada tratamiento y concentración.  $n_{\text{replica}} = 3$  replicados,  $n_{\text{total}} = 3$  ensayos.**

#### 4.1.3.2.4 Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en la proliferación y migración de las línea MDA-MB 231 en pez cebra

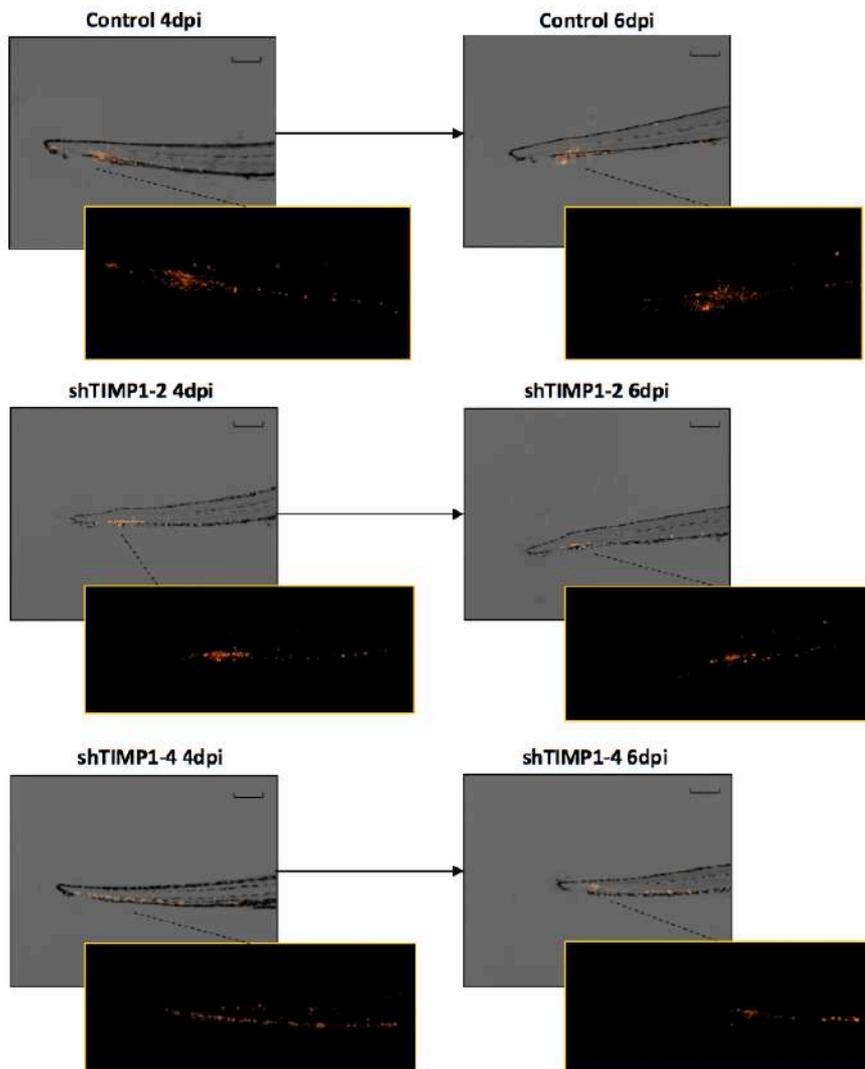
Los embriones de pez cebra fueron inyectados en circulación con la línea control MDA-MB 231, así como con sus análogos silenciados para poder analizar las diferencias de proliferación y capacidad de migración debidas al silenciamiento del gen *TIMP1* en la línea MDA-MB 231.

Células de las líneas shTIMP1\_2, shTIMP1\_4 y PLKO fueron concentradas e inyectadas en la circulación (Ducto de Cuvier) de los embriones de pez cebra a las 48 hpf e incubados durante 6 dpi a 34°C para poder analizar la proliferación de las distintas líneas en la región del tejido hematopoyético caudal del embrión de pez cebra.

Es importante destacar que el crecimiento tumoral de las líneas silenciadas en el gen *TIMP1* comparadas con su control de silenciamiento, dio como resultado una proliferación un 58% y un 63% significativamente menor en las shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4, respectivamente (Figuras 31 y 32).



**Figura 31: Proliferación de las líneas shTIMP1\_2, shTIMP1\_4 y PLKO en pez cebra. Crecimiento tumoral normalizado ( $n_{\text{replica}} = 15$  embriones/condición,  $n_{\text{total}} = 45$  embriones/condición; 4dpi, 4 días post-inyección; 6dpi, 6 días post-inyección; T-Test;  $*p < 0.05$ ).**



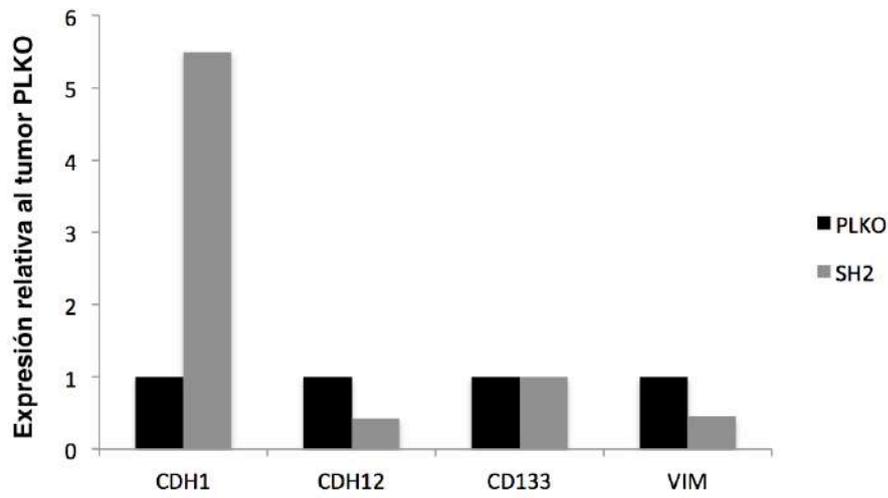
**Figura 32: Proliferación de las líneas shTIMP1\_2, shTIMP1\_4 y PLKO (marcadas con DiI) en pez cebra. Imágenes representativas de los embriones inyectados en las diferentes condiciones de la línea celular comparando 4dpi (4 días post-inyección) y 6dpi (6dpi, 6 días post-inyección). Escala 250  $\mu$ m.**

#### **4.1.3.2.5 Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en la proliferación y formación de metástasis de la de línea MDA-MB 231 en un modelo murino.**

Los ratones hembra SCID de 5 semanas fueron inyectados en el tejido mamario con las líneas shTIMP1\_2 y PLKO para, de este modo, poder analizar las diferencias tanto en la capacidad de formar un tumor primario como en formación de metástasis a distancia debidas al silenciamiento del gen *TIMP1*. Para este ensayo se seleccionó la línea shTIMP1\_2 porque fue la que mostró efectos más significativos en todos los ensayos funcionales.

Los tumores formados tras la inyección empezaron a detectarse a las 3 semanas y presentaron una reducción de volumen del 70% (a punto final) y estadísticamente significativa en el caso de la línea silenciada en comparación con el control (Figura 34C y D). En los tumores generados con ambas líneas se detectó diseminación ganglionar, esta diseminación ganglionar ocurrió en un 33% de los casos en los ratones inyectados con las células silenciadas, mientras que en los ratones inyectados con las células control, la diseminación ganglionar ocurrió en el 100% de los casos, sin embargo, los ratones inyectados con las células silenciadas no presentaron nunca metástasis pulmonares, mientras que los inyectados con las células control desarrollaron metástasis pulmonares en la totalidad de los casos (Figura 34 A y B).

Los tumores generados en los ratos se caracterizaron a nivel molecular. Se analizó el mismo panel de características EMT-*stemness*, que se había analizado en las líneas shTIMP1\_2 y PLKO en cultivo. Tras el análisis se observó que, tal y como se había observado en las líneas celulares, los tumores generados a partir de las células silenciadas presentaron niveles más altos de *CDH1* y niveles más bajos de *CDH12* que los generados a partir de las células control confirmando que en el modelo murino se mantiene la reversión a un fenotipo más epitelial tras el silenciamiento de *TIMP1* (Figura 33).



**Figura 33:** Análisis de los niveles de expresión de CDH1, CDH12, CD133 y VIM analizados mediante RT-q-PCR en los tumores generados en los ratones inyectados con las líneas MDA-MB 231 PLKO y shTIMP1\_2 respectivamente. (n=3).



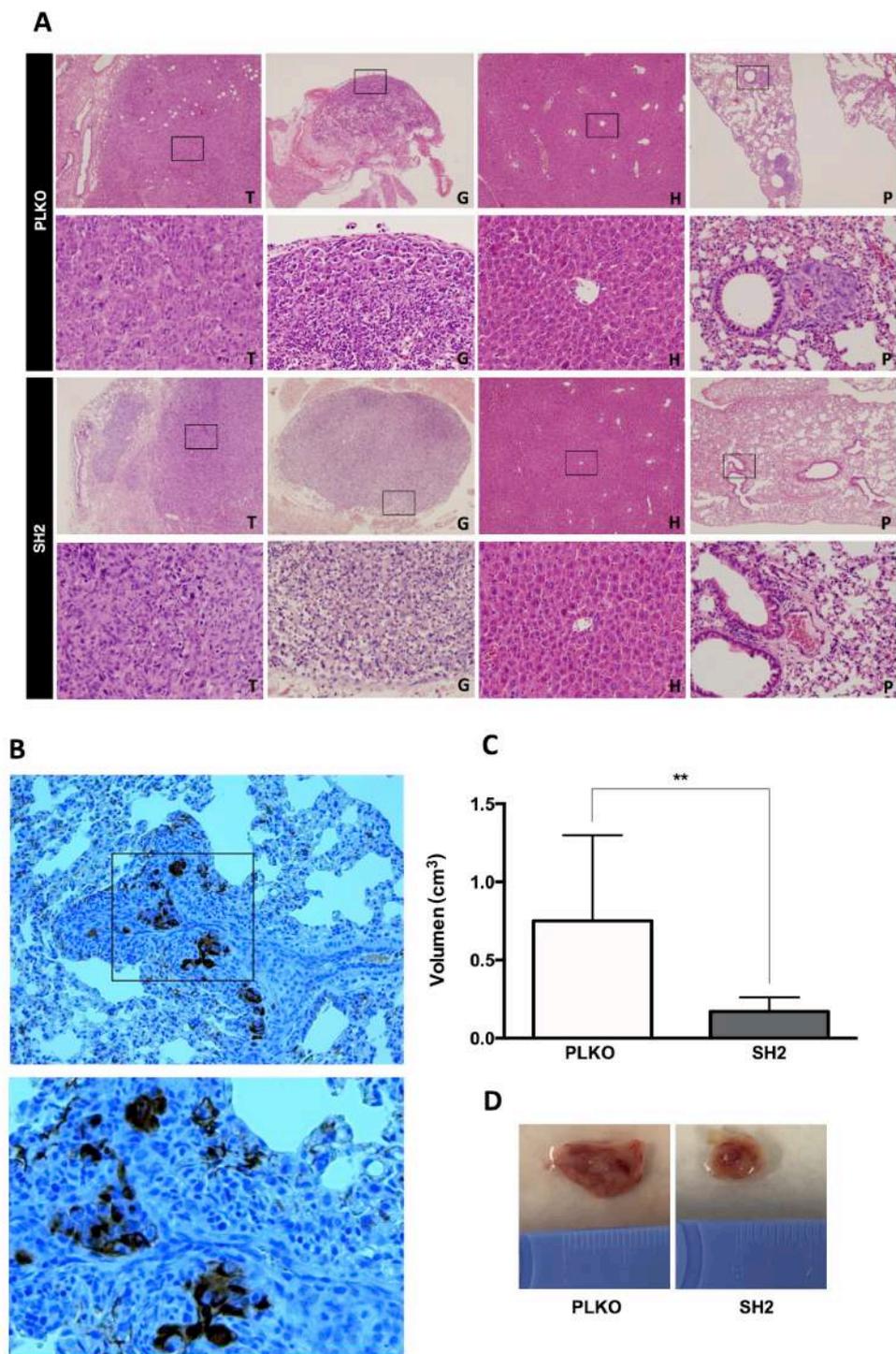


Figura 34: Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en el crecimiento y diseminación de las MDA-MB 231 en un modelo murino. A, Imágenes representativas de hematoxilina/eosina de los distintos tejidos analizados en los ratones inyectados con la línea control y su respectivo silenciamiento. T: Tumor primario; G: Ganglio axilar; H: Hígado; P: Pulmón. Imágenes a 4X y sus respectivas magnificaciones (recuadro) a 20X.

B, Imagen de inmunohistoquímica para CK EA1/EA3, realizada en tejido pulmonar en el grupo control, con el fin de confirmar la metástasis pulmonar. Imagen a 20X y su respectiva magnificación (recuadro) a 40X. C, Volumen tumoral medio en ambos grupos experimentales ( $n_{\text{replica}}=3$  ratones/condición,  $n_{\text{total}}=9$  ratones/condición; Test de Mann-Whitney;  $**p<0.01$ ). D, Imágenes representativas del volumen tumoral en ambos grupos experimentales.

#### 4.1.4 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CTCs MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENEREACIÓN

##### 4.1.4.1 Aislamiento de las CTCs mediante la tecnología DEPArray y amplificación de genoma completo.

Tras el aislamiento de las CTCs mediante la tecnología CellSearch a partir de muestras de sangre periférica, en las pacientes con un número  $>10$  CTCs se llevó a cabo un segundo aislamiento mediante la tecnología DEPArray, que permitió recuperar tanto de CTCs individualizadas como de grupos de CTCs puros, así como linfocitos control, para su posterior caracterización genética.

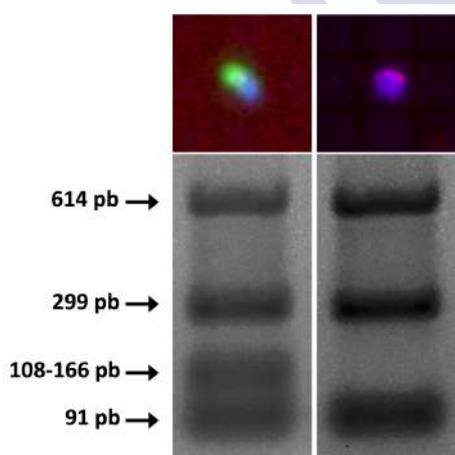
Tabla 13. Resumen de los resultados de cuantificación de CTCs con CellSearch, recuperación con el sistema DEPArray, amplificación de genoma y secuenciación.

Muestra	CTCs CellSearch	CTCs DEPArray			Control de Calidad Ampli1 (bandas)			Secuenciadas
		Individual	Cluster	Grupo	1	2	3-4	
M-IDB 14	333	17	1	4	0	0	4	4
M-IDB 16	52	8	16	0	0	0	0	0
M-IDB 18	193	11	0	5	1	1	0	2
M-IDB 19	28	8	0	0	0	0	1	1
M-IDB 21	344	9	0	0	0	0	0	0
M-CHUS 20	969	19	0	3	0	0	0	0
M-CHUS 38	18	18	0	2	0	0	3	3
M-CHUS 39	>1000	2	0	0	0	1	0	0

Tal y como se muestra en la Tabla 13 la eficiencia de recuperación de CTCs con el sistema DEPArray fue muy baja en casi todos los casos. Con este sistema se individualizan las células y se analiza la expresión de CKs y CD45. Una vez identificadas las células o *clústers* de células de interés se recuperan mediante la generación de un campo dieléctrico que es capaz de mover las células a través del circuito. En la Tabla 13 se resume el número de CTCs identificadas con el sistema CellSearch y las que se consiguieron identificar y recuperar con el sistema DEPArray. Tras la recuperación de las células

hay un paso crítico de reducción de volumen previo a la amplificación de genoma completo en el que también hay riesgo de pérdida de las células. Este paso, a tenor de los resultados obtenidos tras el paso de amplificación, fue también muy poco eficiente.

La amplificación de genoma completo se llevó a cabo utilizando el kit comercial basado en PCR Ampli1 WGA. El análisis de la eficiencia de amplificación se realizó, tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos, analizando mediante PCR 4 secuencias conservadas y representativas distintas localizaciones del genoma humano. Tras la PCR la ausencia de bandas en el gel de agarosa indicó un fallo en la amplificación de genoma completo o ausencia de material para amplificar, la presencia de una o dos bandas indicó una calidad del producto de amplificación baja-media, mientras que la presencia de tres o cuatro bandas se asoció a una amplificación óptima (Figura 35). En nuestro estudio debido a la limitación de muestra al final de todo el proceso se incluyeron también muestras con una y dos bandas obteniendo buenos resultados tras la secuenciación.



**Figura 35:** Ejemplos representativos de los resultados obtenidos tras el control de calidad llevado a cabo tras la amplificación de genoma completo en dos células individuales mediante el kit de amplificación Ampli1.

#### 4.1.4.2 Análisis de las CTCs mediante secuenciación

Tras el aislamiento mediante la tecnología DEPArray y la amplificación de genoma completo, las muestras se analizaron utilizando secuenciación masiva dirigida mediante el uso del panel OncoPrint Comprehensive Assay V3 (ThermoFisher), que permite analizar alteraciones en 161 genes (genes completos o *hotspots*) frecuentemente alterados en cáncer. Con este panel analizamos tanto mutaciones de cambio de un nucleótido, *Indels* como variaciones en número de copias, con el fin de determinar las variantes específicas en CTCs o *clusters* en relación a tumor primario y/o metástasis.

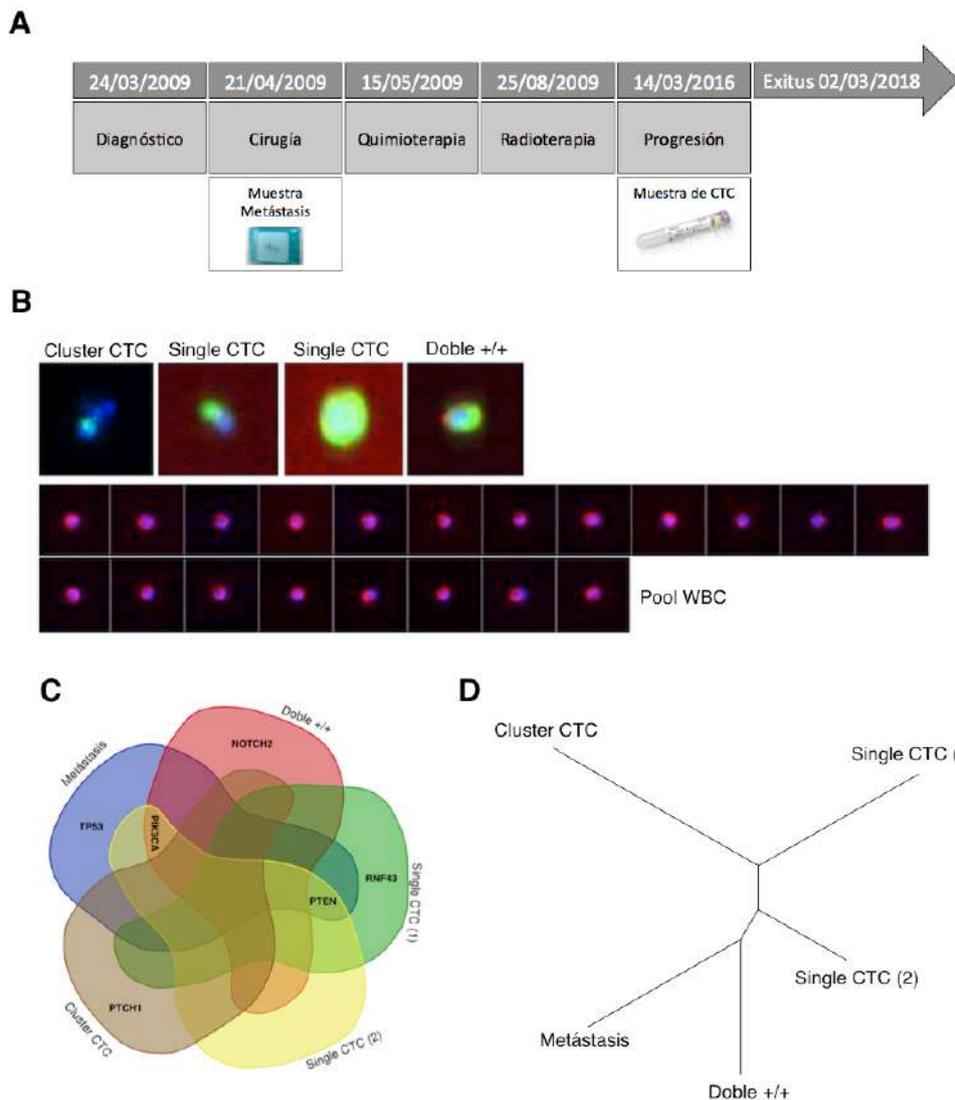
Finalmente se pudieron caracterizar las muestras de 4 pacientes (M-IDB14, M-IDB18, M-IDB19, M-CHUS 38). Se analizaron entre 3 y 5 muestras por paciente, que incluyeron tumor primario, y diferentes CTCs, tanto individualizadas, como en *pool* y *clusters*, con el fin de caracterizar genéticamente la población tumoral circulante, su heterogeneidad y la evolución genética del tumor en distintos momentos de la enfermedad.

A continuación, se describen los resultados del estudio genético en cada una de las pacientes analizadas:

En la paciente **M-CHUS 38** dispusimos solamente de muestra de tejido de la metástasis (Figura 36A) obtenida en cirugía y la muestra de CTCs en el momento de progresión tras recibir quimioterapia y radioterapia (un año más tarde de la cirugía) para secuenciar. De la población circulante se secuenciaron dos células individuales CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>, una célula con marcaje CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup> y un pool de 3 células compuesto por una célula con marcaje convencional (CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>) y dos células CKs<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Se analizó también como control de alteraciones germinales un *pool* de linfocitos (CKs<sup>-</sup> y CD45<sup>+</sup>) (Figura 36B).

Tras el análisis de NGS en tejido metastásico se identificaron mutaciones en los genes *TP53*, *PIK3CA* y *PTEN*. En una de las CTCs

con marcaje convencional (CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>), se identificaron las mismas mutaciones en *PIK3CA* y *PTEN* mientras que en la otra además de *PTEN* se encontró mutado el gen *RNF43*. Por otra parte, en la célula doble positiva (CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup>) analizada se identificó la misma variante en *PIK3CA* presente en tejido, además de una adicional en *NOTCH2*, sugiriendo su origen tumoral a pesar del marcaje para CD45. Por último, el *cluster* de CTCs analizado mostró solamente una mutación puntual en *PTCH1*, no compartida ni con el tejido ni con ninguna de las otras células circulantes analizadas. Es importante destacar solo el 33% de las alteraciones identificadas (*PI3KCA* y *PTEN*) fueron compartidas entre la metástasis y alguna de las CTCs. Entre la población circulante la variante en *PTEN* fue la que apareció con mayor frecuencia, sugiriendo que el clon tumoral dominante en el momento de la progresión presentaba dicha mutación (Figura 36C). Así en el análisis filogenético mostró que las tres células individuales analizadas estaban más próximas genéticamente que las células identificadas en el *cluster* (Figura 36D).

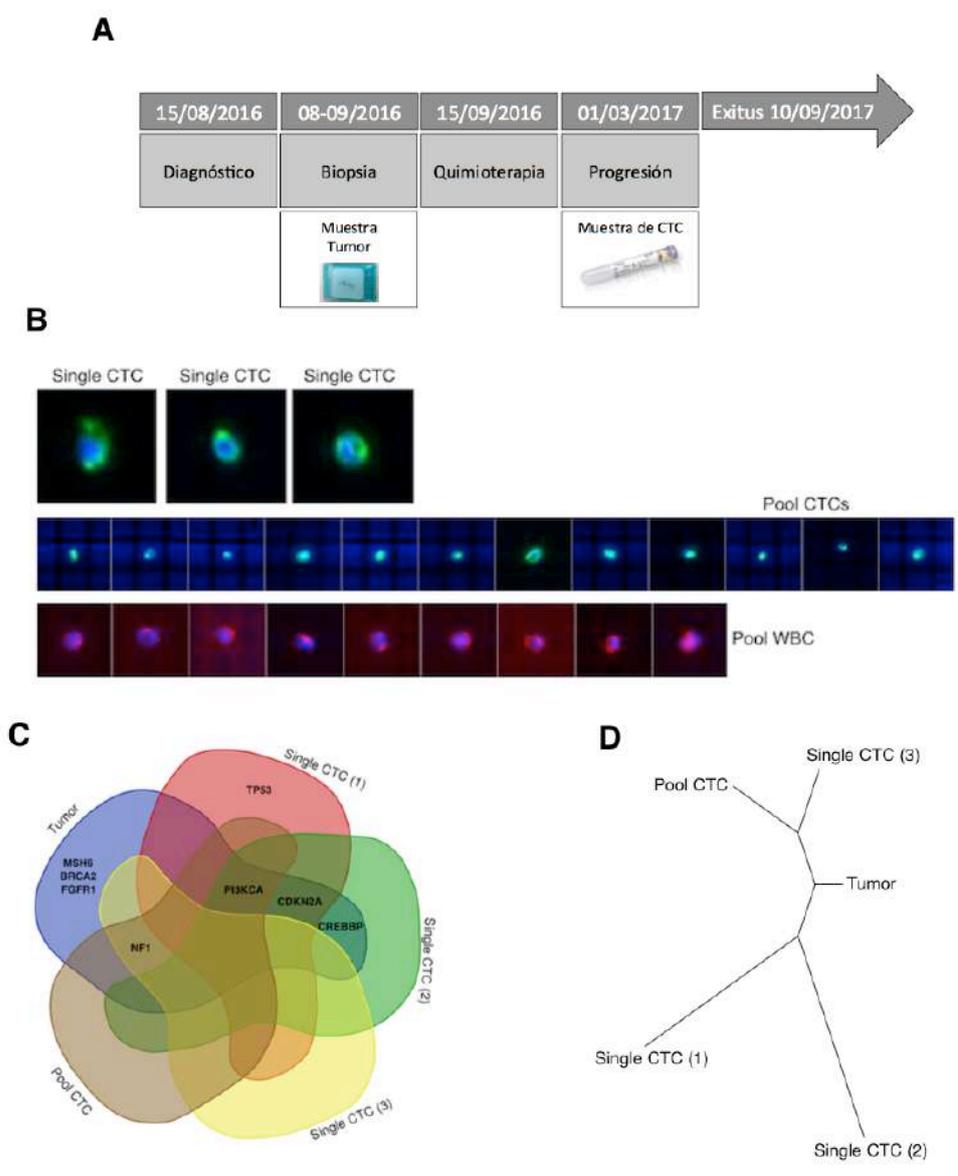


**Figura 36: Paciente M-CHUS 38.** A, Línea temporal del curso clínico de la paciente. B, Células analizadas (el *pool* de *WBC* o linfocitos se utiliza como control de alteraciones germinales) (DAPI: azul; CK: verde; CD45: rojo). C, Diagrama de Venn representativo de las mutaciones compartidas entre las distintas muestras analizadas. D, El árbol filogenético se calculó utilizando la distancia de *hamming* y el método de Neighbor-Joining Tree.

En la paciente **M-IDB 14** dispusimos de una muestra del tumor primario obtenida mediante biopsia y la muestra de CTCs en el momento de progresión a quimioterapia neoadyuvante, 6 meses más tarde de la biopsia, en la que aparecen metástasis cutáneas, óseas,

ganglionares, derrame pleural y pericárdico (Figura 37A). En la población circulante dispusimos de 3 CTCs individuales y un pool de 12 CTC, todas ellas con el marcaje convencional (CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>) (Figura 37B). El análisis del tumor primario identificó mutaciones en los genes *MSH6*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *BRCA2*, *NF1*, *CREBBP* y *FGFR1*. En una de las CTCs individuales analizadas se encontró alterado *NF1*, en otra encontramos mutaciones en *PIK3CA*, *CDKN2A* y *CREBBP* y, finalmente, en la tercera encontramos mutaciones en *PIK3CA*, *CDKN2A* y *TP53*. Esta última variante patogénica fue exclusiva, ya que no apareció ni en tejido ni en las otras CTCs. Por último, en el *pool* de CTCs, sorprendentemente, sólo se encontraron mutaciones en *PIK3CA* y *NF1* (Figura 37 C).



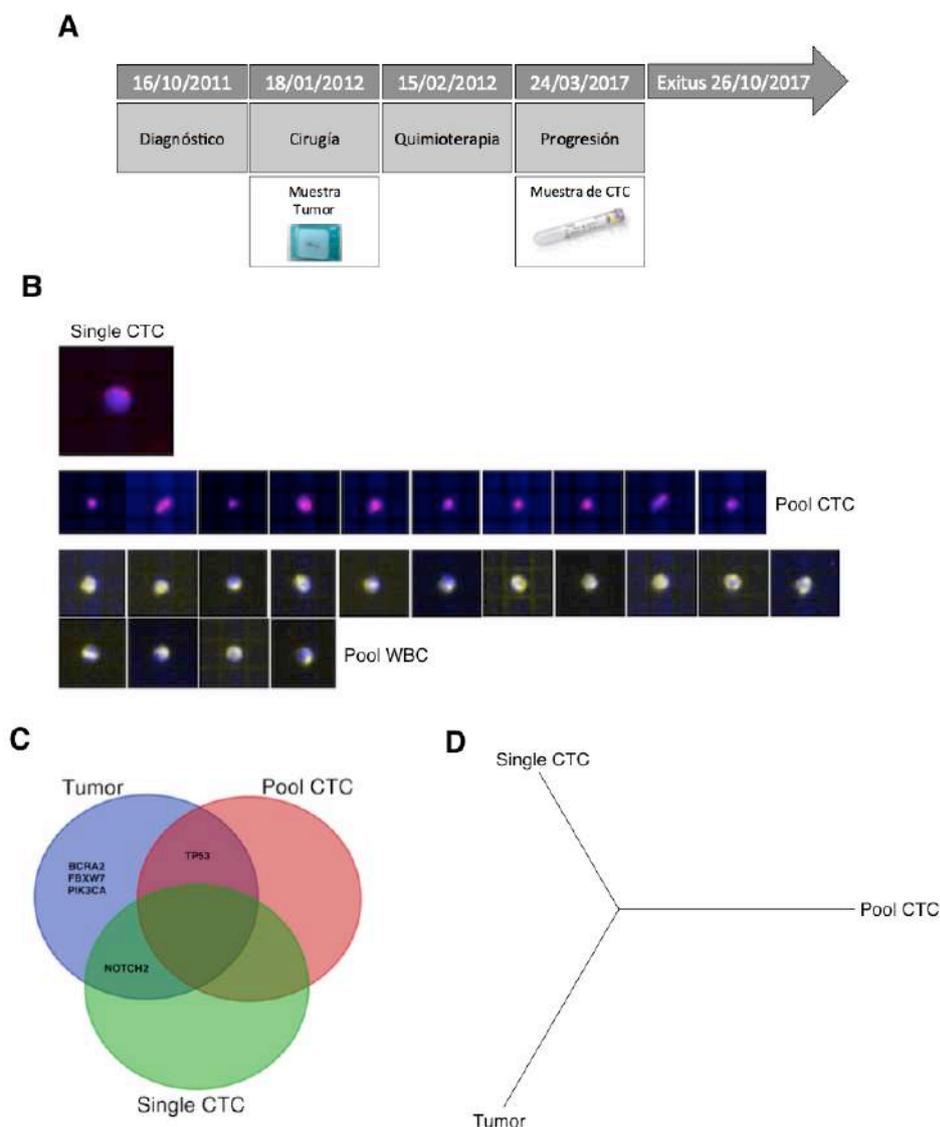


**Figura 37: Paciente M-IDB 14. A, Línea temporal del curso clínico de la paciente. B, Células analizadas (el *pool* de linfocitos se utiliza como control de alteraciones germinales) (DAPI: azul; CK: verde; CD45: rojo). C, Diagrama de Venn representativo de las mutaciones compartidas entre las distintas muestras analizadas. D, El árbol filogenético se calculó utilizando la distancia de *hamming* y el método de Neighbor-Joining Tree.**

Es importante destacar que el 50% de las mutaciones (*PIK3CA*, *CDKN2A*, *CREBBP* y *NF1*) se identificaron tanto en la muestra de tumor primario como de las CTCs. Esto indica que pueden ser mutaciones driver que caracterizan a la población tumoral que consiguió diseminar y generar las metástasis en el momento de la progresión. Es importante destacar que la enfermedad metastásica en el momento de la recogida de la muestra era muy importante, con distintas localizaciones por lo que la población circulante podría estar reflejando la impronta genética de distintos focos tumorales. En consonancia encontramos heterogeneidad entre las distintas CTC. En las tres CTCs analizadas solo la variante en *PIK3CA* es común a todas ellas, analizadas tanto a nivel de célula única como en *pool*. Respecto al pool de CTCs sorprende que no aparezcan todas las mutaciones presentes en la CTCs individuales. Probablemente, este resultado esté relacionado con una pérdida de representación de CTCs con las otras mutaciones y refuerza el interés de hacer estudios a nivel de célula única. Así en el análisis filogenético mostró que dos de las células individuales analizadas estaban más próximas genéticamente entre si mientras que la restante se encuentra más cercana al pool analizado al ser presentar está una alta heterogeneidad mutacional (Figura 37D).

La paciente **M-IDB 18** debutó con enfermedad localizada en el año 2011, en el que fue sometida a cirugía de la que se obtuvo la muestra de tumor primario analizada en el presente estudio. Tras recibir terapia adyuvante la paciente estuvo libre de enfermedad hasta 2017 donde aparecieron metástasis óseas, hepáticas, pleurales y ganglionares (Figura 38A). En ese momento se recogió la muestra de CTCs. Para el estudio de secuenciación dispusimos, por tanto, de una muestra del tejido primario, una CTCs individual y un pool de 10 CTCs (Figura 38B). Tras el estudio de secuenciación se identificaron mutaciones en los genes *BRCA2*, *FBXW7*, *NOTCH2*, *PIK3CA* y *TP53* en el tejido primario. En la población circulante presente en el momento de la progresión metastásica identificamos solo las mutaciones en *TP53* y *NOTCH2*. Indicando que estas dos mutaciones caracterizarían a la población tumoral que sobrevivió a la cirugía y

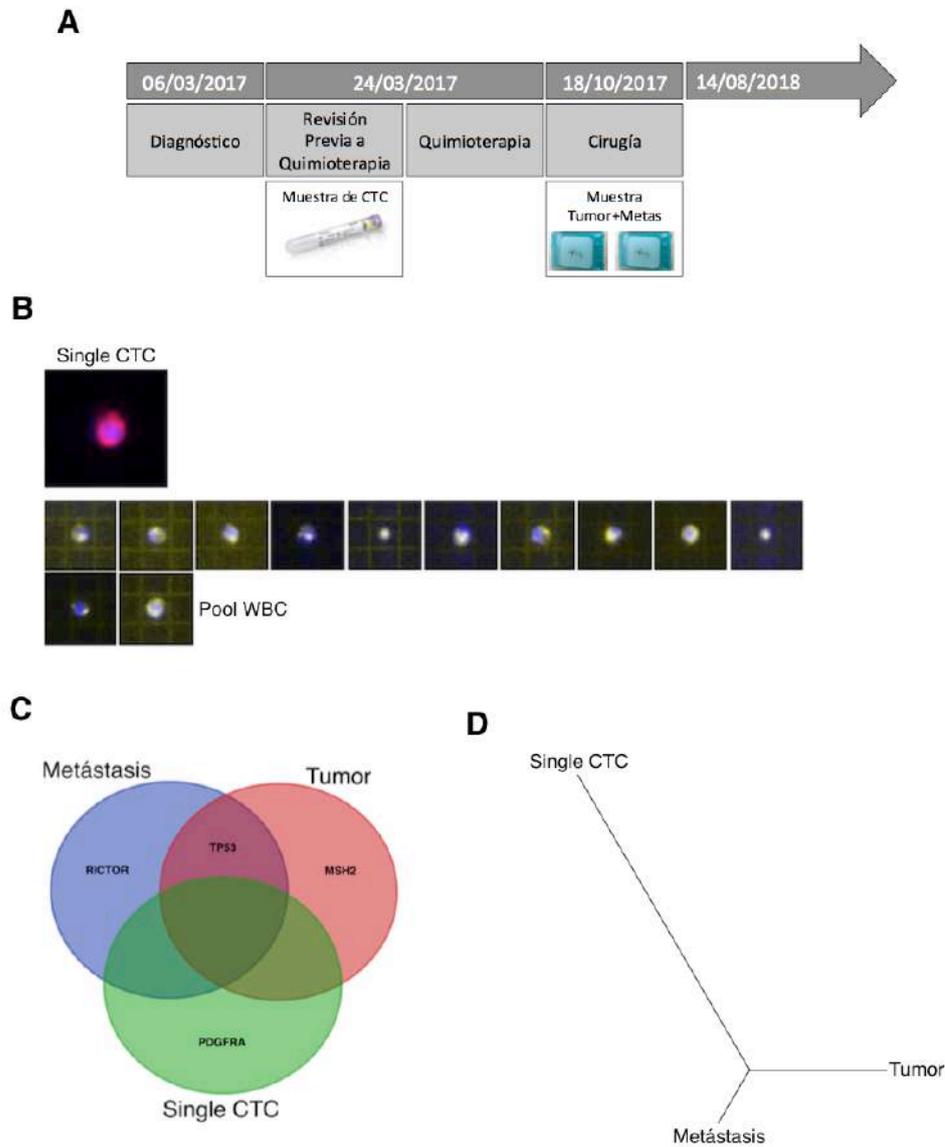
tratamiento de quimioterapia inicial y causó la recurrencia tiempo después, aunque para validar estos datos sería importante disponer de muestras de los focos metastásicos. De nuevo sorprende el bajo número de alteraciones identificadas en el *pool* de CTCs, solamente una y no aparece la mutación identificada en la CTCs analizada de forma individual (Figura 38C y D).



**Figura 38: Paciente M-IDB 18. A, Línea temporal del curso clínico de la paciente. B, Células analizadas (el pool de *WBC* o linfocitos se utiliza como control de alteraciones germinales) (DAPI: azul; CK: rojo; CD45: amarillo). C, Diagrama de Venn representativo de las mutaciones compartidas entre las distintas muestras analizadas. D,**

El árbol filogenético se calculó utilizando la distancia de *hamming* y el método de Neighbor-Joining Tree.

La paciente **M-IDB 19** fue diagnosticada de un tumor TN con diseminación ganglionar a principios de 2017 y se le recogió en ese momento la muestra de CTCs (Figura 39A). Empieza tratamiento con quimioterapia y es intervenida del tumor primario en 7 meses después. Para el análisis de secuenciación de esta paciente dispusimos del tejido del tumor primario una metástasis ganglionar tras quimioterapia y una CTC individual presente en circulación en el momento de diagnóstico (Figura 39B). En el tumor primario se identificaron mutaciones en los genes *MSH2* y *TP53* (dos variantes diferentes, c.2228C>G y c.833C>G) mientras que en el tejido metastásico la variante c.833C>G en *TP53* y una amplificación de 7.6 copias en el gen *RICTOR*. Por otra parte, en la CTC analizada no se identificó ninguna de estas alteraciones, pero sí una variante patogénica en *PDGFRA* (Figura 39C). El estudio filogenético claramente separó el tumor primario y la metástasis ganglionar de la CTC, evidenciando que entre la muestra de sangre a diagnóstico y la cirugía tuvo lugar un periodo de selección clonal causado por la presión del tratamiento (Figura 39D).



**Figura 39: Paciente M-IDB 19. A, Línea temporal del curso clínico de la paciente. B, Células analizadas (el pool de *WBC* o linfocitos se utiliza como control de alteraciones germinales) (DAPI: azul; CK: rojo; CD45: amarillo). C, Diagrama de Venn representativo de las mutaciones compartidas entre las distintas muestras analizadas. D, El árbol filogenético se calculó utilizando la distancia de *hamming* y el método de Neighbor-Joining Tree.**

## **4.2 RESULTADOS CÁNCER DE OVARIO**

### **4.2.1 VALOR CLÍNICO DEL CONTAJE DE CTCs EN PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO**

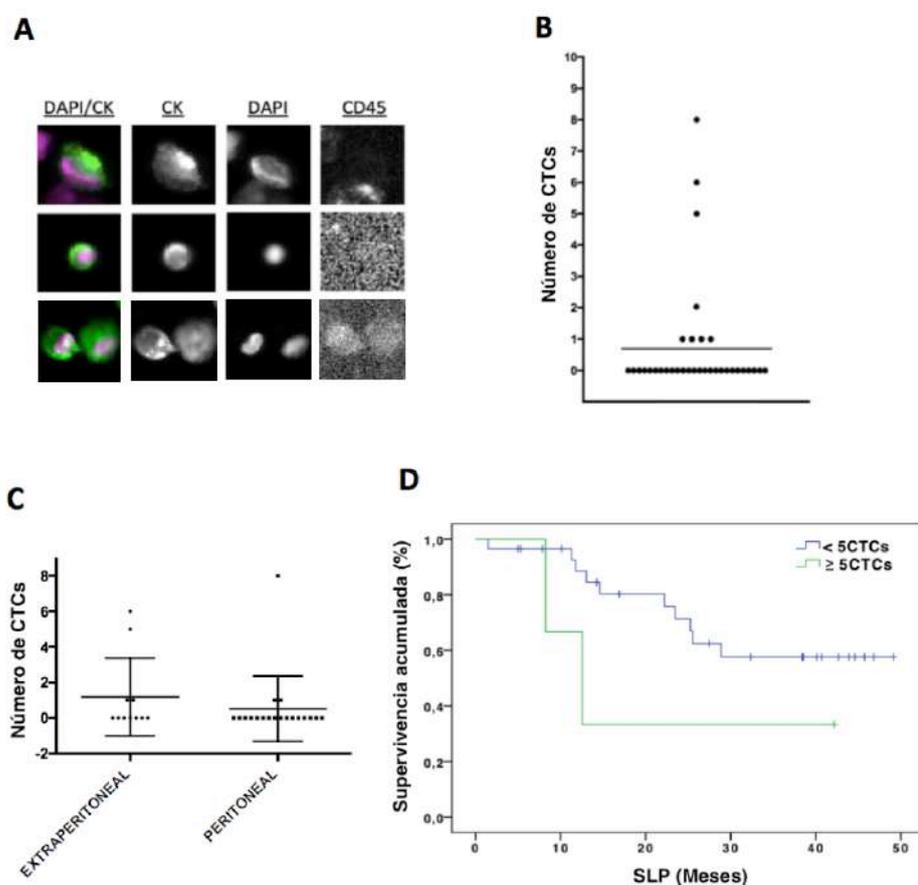
#### **4.2.1.1 Características de las pacientes.**

Un total de 38 pacientes procedentes del MD Anderson Cancer Center (Madrid), fueron incluidas en el estudio en el periodo comprendido entre los años 2014 y 2016 (Tabla 4 de materiales y métodos). De ellas, 25 (65,8%) se incluyeron en el momento del diagnóstico y 11 en el momento de recurrencia de la enfermedad (28,9%). La mayoría de los tumores fueron del tipo seroso y de alto grado. Por otra parte, 19 (50%) de las pacientes presentaron diseminación peritoneal, mientras que 11 (28,9%) presentaron metástasis a distancia, principalmente en el hígado. En cuanto al estado de BRCA la mutación fue detectada en 10 de las pacientes (26,3%). La mediana de SG y SLP desde la toma de muestra fue 29,9 (0,39-49,1) y 22,8 (0,39-49,1) meses, respectivamente.

#### **4.2.1.2 Contaje de CTCs en pacientes con cáncer de ovario mediante la tecnología CellSearch: asociación con variables clínicas y valor pronóstico.**

El número de CTCs presentes en 7,5 ml de sangre periférica de las 38 pacientes incluidas en el estudio fue evaluado mediante el uso de la tecnología CellSearch. Por lo tanto, únicamente fueron evaluadas las CTCs que presentaron expresión positiva de EpCAM y CKs (Figura 40A). En 8 (21%) de pacientes se detectaron CTCs, en un rango de 1 a 8 células, y una de las pacientes presentó 2 *clusters* de CTC compuestos de dos células cada uno de ellos (Figura 40B). Es interesante remarcar que el porcentaje de pacientes con CTCs fue superior en las pacientes que presentaban diseminación extra-peritoneal (40%) en comparación con las pacientes con diseminación únicamente peritoneal (15,8%), aunque la diferencia no fue

estadísticamente significativa ( $p=0,38$  test  $X^2$  de Pearson) (Figura 40C). Por otra parte, la presencia de CTCs ( $\geq 1$  CTCs) no se asoció con peores tiempos de SG ni SLP, sin embargo, las pacientes con un número de CTCs  $\geq 5$  ( $n=3$ ) presentaron peor SLP [20,9 (CI 3,9-38)] en comparación con las pacientes con  $<5$  CTCs [36,1 (CI 29,7-42,5)], aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,18$ , test Log-Rank) (Figura 40D).



**Figura 40:** Análisis de la población de CTCs en pacientes con cáncer de ovario mediante la tecnología CellSearch. A, Ejemplo de CTCs con marcaje positivo para CKs y DAPI y negativo para CD45. B, Cuantificación de CTC presentes en 7,5 ml de sangre periférica en pacientes con cáncer de ovario. C, Contaje de CTCs en función de la presencia de metástasis peritoneales o extra-peritoneales. D, Curvas Kaplan-Meier para SLP en función del contaje de CTCs ( $<5$  vs  $\geq 5$  CTCs/7,5ml sangre) ( $p=0,18$ , test Log-Rank).

## **4.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CTCs DE PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO**

### **4.2.2.1 Cuantificación y caracterización de CTCs mediante RT-q-PCR**

Además de la cuantificación mediante el sistema CellSearch, al igual que se hizo en la cohorte de pacientes con CMTN, la población de CTCs EpCAM positiva se aisló manualmente con sistema Cellaction, que como ya se ha comentado anteriormente, aísla también CTCs EpCAM positivas. La presencia de una población circulante adicional en los pacientes se confirmó tras el inmunoenriquecimiento mediante el análisis de la expresión por RT-qPCR de *GAPDH* y *PTPRC* (*CD45*) en las muestras procedentes de 38 pacientes y 20 controles sanos. Tal y como se observa en la Figura 34 los niveles de *GAPDH* en el grupo de pacientes fueron significativamente superiores al grupo de controles sanos, mientras que los niveles de *CD45* no presentaron diferencias significativas, confirmando la presencia de una población adicional en las muestras de las pacientes (Figura 41 A y B).

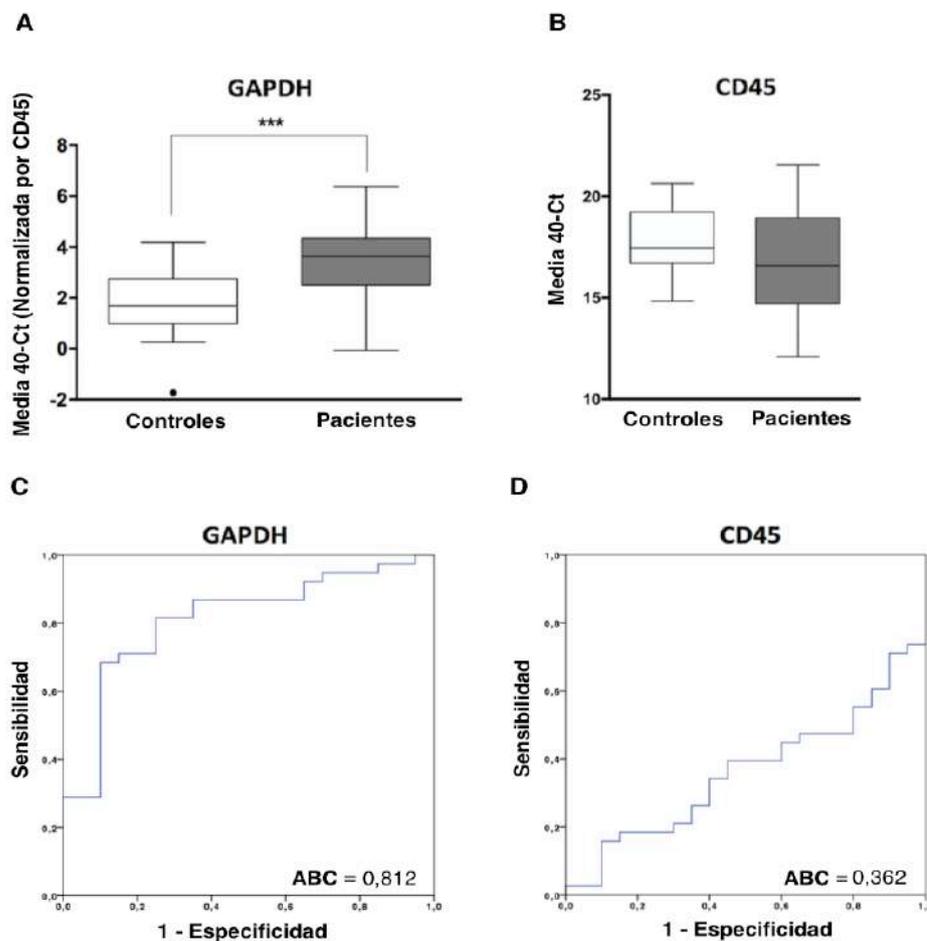


Figura 41: A y B, Niveles de expresión de *GAPDH* y *CD45* en la fracción inmuno-aislada de pacientes y controles, analizados mediante RT-q-PCR (Test de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ ). C y D, Valor diagnóstico de los niveles de expresión de *GAPDH* y *CD45* (curvas ROC) para discriminar controles y pacientes. ABC, área bajo la curva.

Por otra parte, el análisis con curvas ROC confirmó la capacidad de los niveles de expresión de *GAPDH* para discernir entre controles y pacientes ( $ABC = 0,81$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que la curva ROC para *CD45* presentó un ajuste cercano a la diagonal, confirmando la ausencia de diferencias entre controles y pacientes (Figura 41 C y D).

Una vez confirmada la presencia de CTCs en la sangre de las pacientes, se caracterizó el perfil de expresión de las mismas mediante RT-q-PCR, llevando a cabo el análisis de un panel de genes relacionados con características epiteliales (*MUC1*, *CK19*, *EPCAM*),

con el proceso de EMT (*CXCR4*, *TIMP1*, *GDF1*) y con características de célula madre (*ALDH1*, *CD24*, *CD44*). Tras el análisis de primer grupo de muestras se observó que los marcadores EpCAM, ALDH1 y GDF1 no se expresaban o presentaban unos valores de expresión muy bajos, por este motivo se descartaron para los siguientes análisis.

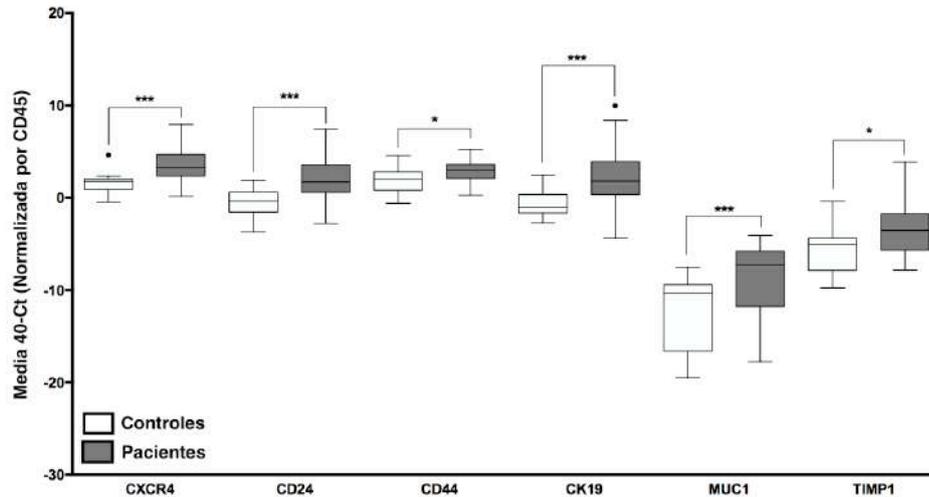
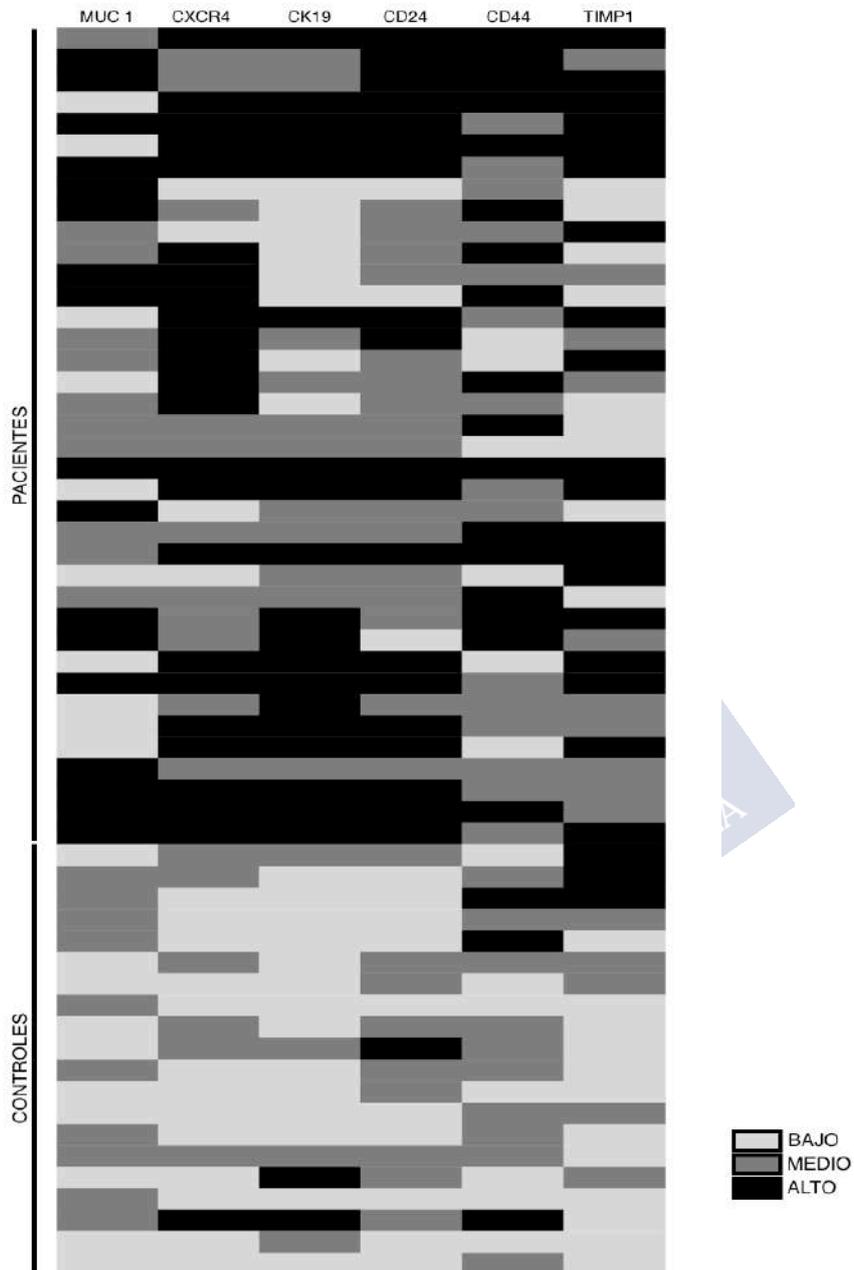


Figura 42: Perfil de expresión génica en CTCs de cáncer de ovario en comparación con la fracción aislada inespecíficamente en controles sanos. Grupo de controles (cajas blancas), grupo de pacientes (cajas grises) (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Entre los genes relacionados con **características epiteliales** se encontró un incremento significativo en los niveles de expresión de *MUC1* y *CK19* en las muestras de pacientes en comparación con controles sanos, ratificando que la población tumoral circulante aislada tiene un origen epitelial. Con respecto a los **marcadores** relacionados con el proceso de **EMT** se encontró un incremento significativo en *TIMP1* y *CXCR4* en *pacientes*, al igual que los marcadores asociados a fenotipo de **célula madre** *CD24* y *CD44* (Figuras 42 y 43). Este patrón de expresión indica que las CTCs de pacientes de ovario se caracterizan, al igual que la cohorte de pacientes con tumores TN, por un fenotipo de alta plasticidad celular en donde se coexisten tanto marcadores epiteliales como mesenquimales y de célula madre.



**Figura 43:** *Heatmap* representativo del perfil de expresión génica identificado en CTCs de pacientes con cáncer de ovario en comparación con la fracción inmunoaislada inespecíficamente en controles sanos. El color gris claro representa valores que se encuentran por debajo del percentil 33, el gris oscuro valores que se encuentran entre los percentiles 33-66 y el negro valores que se encuentra por encima del percentil 66.

#### 4.2.2.2 Estudio de correlación entre el número de CTCs obtenido con el sistema CellSearch y los niveles de los marcadores analizados mediante RT-q-PCR

Por otra, parte se llevó a cabo un estudio de correlación entre los resultados obtenidos al analizar el perfil de marcadores de las CTCs y el conteaje celular obtenido mediante la tecnología CellSearch. Este análisis confirmó que las pacientes en las cuales no se detectaron CTCs por CellSearch, presentaron valores bajos de todos los marcadores estudiados, siendo la correlación estadísticamente significativa en el caso de *TIMP1* ( $p=0,02$ ) y *MUC1* ( $p=0,006$ ).

#### 4.2.2.3 Valor diagnóstico del panel de expresión identificado en CTCs

Con el fin de evaluar la capacidad de cada uno de los marcadores presentes en la población de CTCs para diferenciar la población de controles sanos y pacientes se realizó un estudio mediante curvas ROC, en el que todos los marcadores presentaron un ABC mayor de 0,65 y un valor p significativo en todos los casos (Tabla 14).

Tabla 14: Resultados del estudio del poder diagnóstico de los marcadores mediante curvas ROC.

Marcador	ABC	P	IC 95%
<i>MUC1</i>	0,812	<0,001	0,703-0,920
<i>CXCR4</i>	0,880	<0,001	0,783-0,976
<i>CK19</i>	0,826	<0,001	0,718-0,933
<i>CD24</i>	0,845	<0,001	0,746-0,945
<i>CD44</i>	0,686	0,021	0,540-0,831
<i>TIMP1</i>	0,696	0,015	0,552-0,840
<i>GAPDH</i>	0,812	<0,001	0,695-0,929

ABC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza

Por otra parte, analizando todos los marcadores se consiguió generar un modelo de regresión logística combinando con solo cuatro de ellos (*GAPDH*, *TIMP1*, *CK19* y *MUC1*) que mejora la capacidad diagnóstica de los marcadores por separado, permitiendo clasificar como positivas para CTCs a un 63% de las pacientes (Figura 44).

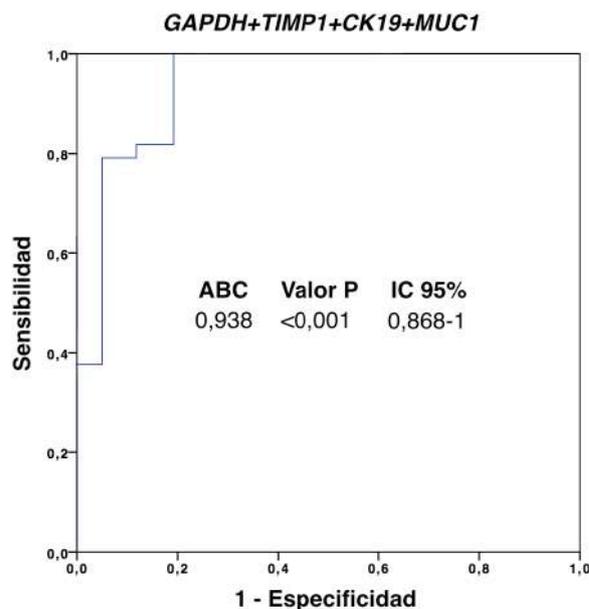


Figura 44: Modelo ROC de regresión logística combinando los marcadores *GAPDH*, *TIMP1*, *CK19* y *MUC1*.

#### 4.2.2.4 Correlación de los marcadores de CTCs con las variables clínicas y la supervivencia de las pacientes

Tras analizar la posible asociación entre los niveles de expresión de los marcadores y las características clínicas de las pacientes, se observó que las pacientes que no presentaban mutaciones en *BRCA* tenían valores más bajos de todos los marcadores, siendo esta diferencia significativa para *MUC1* ( $p=0,003$ ). Con respecto a los niveles séricos del marcador CA125 se observó que todas las pacientes con niveles altos de expresión de *CD44* y *GAPDH*

presentaron a su vez niveles séricos altos de CA125, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

Por otro lado, con el objetivo de determinar el valor pronóstico de los marcadores para predecir SG y SLP, se llevó a cabo un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para todos los marcadores estudiados. Ninguno de los marcadores mostró impacto en supervivencia. Una posible causa de este resultado puede ser el limitado seguimiento disponible para algunas de las pacientes que tuvieron que ser censuradas.

#### **4.2.3 VALIDACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INHIBICIÓN DE TIMP1 COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE OVARIO**

Tras el estudio de caracterización del perfil de expresión de la población tumoral circulante de nuestra cohorte de pacientes con cáncer de ovario demostramos que esta población presenta un fenotipo de EMT intermedio y marcadores de célula madre. Entre los marcadores que están caracterizando la población de CTCs de estas pacientes destaca de nuevo la presencia de TIMP1, al igual que sucedió en la población de CTCs de la cohorte de pacientes TN analizadas en el presente trabajo. Este resultado refuerza la idea de que ambos tipos de tumores pueden tener mecanismos de desarrollo y progresión tumorales generales. De nuevo, decidimos estudiar con mayor detalle el papel de TIMP1 en cáncer de ovario ya que su sobre-expresión en tejido de tumores de ovario se ha asociado a un peor pronóstico de las pacientes. Para ello seleccionamos como modelo la línea celular de cáncer de ovario SKOV3. Esta línea celular procede de adenocarcinoma de ovario que genera tumores de histología serosa en modelos murinos (Shaw, Senterman, Dawson, Crane, & Vanderhyden, 2004) y que muestra resistencia a distintos fármacos citotóxicos como el cis-platino y la adriamicina.

#### 4.2.3.1 Estudio “*in vitro*” del impacto del silenciamiento *TIMP1* en el fenotipo de la línea celular SKOV3

El silenciamiento del gen *TIMP1* en la línea celular SKOV3 fue llevado a cabo mediante tecnología shRNA, utilizando partículas lentivirales portadoras de las secuencias de interferencia. Posteriormente las líneas celulares silenciadas fueron seleccionadas en presencia de puromicina y nombradas como shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4, mientras que el control de silenciamiento fue nombrado como PLKO. Dicho silenciamiento fue confirmado mediante RT-q-PCR y mediante Western Blot (Figura 45).

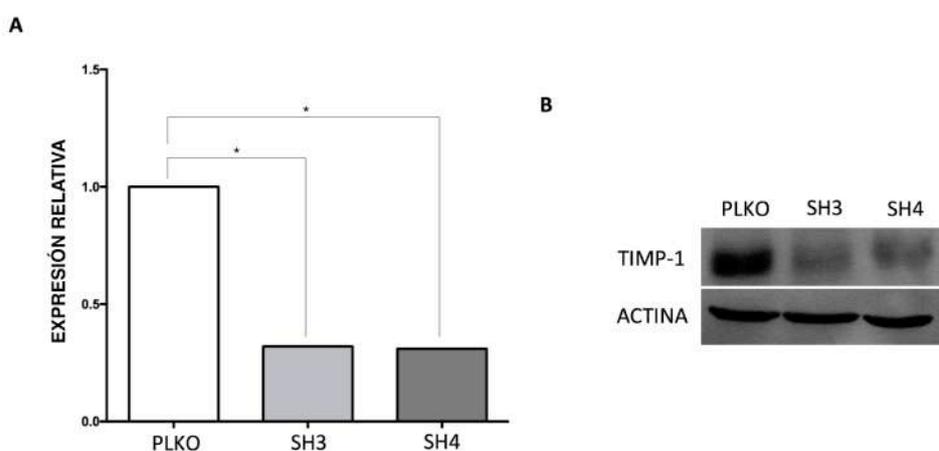


Figura 45: Análisis de los niveles de expresión del gen *TIMP1* en la línea celular SKOV3 tras el silenciamiento. A, Niveles de expresión de *TIMP1* analizados mediante RT-q-PCR en las líneas PLKO, shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4 (n=3). B, Niveles proteicos de *TIMP1* analizados mediante Western Blot en las líneas PLKO, shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4 (n=3).

#### 4.2.3.2 Impacto del silenciamiento de *TIMP1* en la expresión de marcadores de plasticidad celular en la línea SKOV3

Tras el silenciamiento de *TIMP1*, se analizó mediante RT-q-PCR la expresión de *CDH1*, *CDH12*, *CD133* y *VIM*. Se observó un descenso en la expresión de *CDH12* y *CD133* y un aumento de *CDH1* en las líneas silenciadas respecto a la línea control. Sin embargo, no se

observaron variaciones en la expresión de *VIM* (Figura 46). Estos datos sugieren que el silenciamiento de *TIMP1* hace que la línea celular SKOV3 adquiera un fenotipo más epitelial.

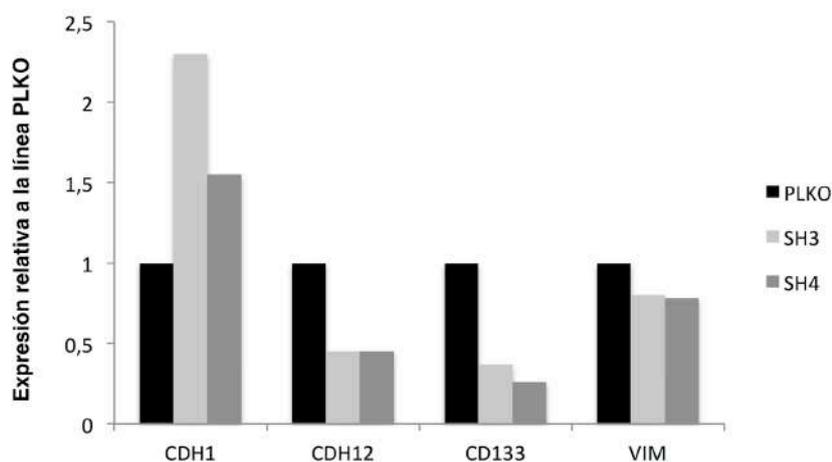


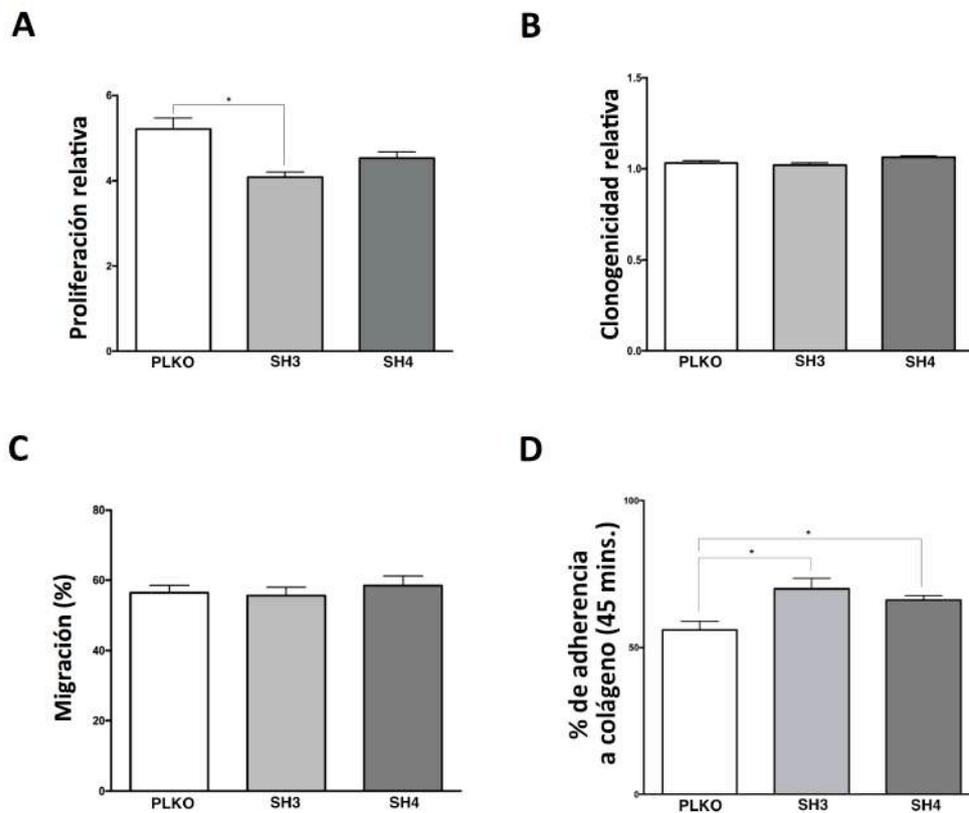
Figura 46: Análisis de los niveles de expresión de CDH1, CDH12, CD133 y VIM analizados mediante RT-q-PCR en las líneas PLKO, shTIMP1\_2 y shTIMP1\_4. (n=3).

#### 4.2.3.3 Efecto del silenciamiento de *TIMP1* en la capacidad de proliferación, clonogenicidad, invasión y adhesión de la línea SKOV3.

Con el fin de evaluar la implicación de *TIMP1* en la proliferación de la línea celular SKOV3 se llevaron a cabo ensayos de proliferación en placa mediante los cuales se observó un descenso en la capacidad proliferativa de las líneas shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4 (reducción de un 22% y un 13%, respectivamente) en cada uno de los casos, mostrando que tras el silenciamiento esta línea celular pierde capacidad proliferativa (Figura 47A). Este descenso solo fue estadísticamente significativo en la línea shTIMP1\_2.

Por otro lado, con el objetivo de determinar la implicación de *TIMP1* en la capacidad de formación de colonias de la línea celular SKOV3 se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias en agar en los cuales no se observaron diferencias en formación de número y

tamaño de colonias entre las líneas silenciadas y la parental (Figura 47B). Tampoco se observó ningún impacto tras el silenciamiento de TIMP1 en la capacidad de migración de la línea SKOV3 tras la realización de ensayos de migración en *transwell* (Figura 47C). Sin embargo, las líneas silenciadas sí mostraron mayor capacidad de adhesión a colágeno (Figura 47D).

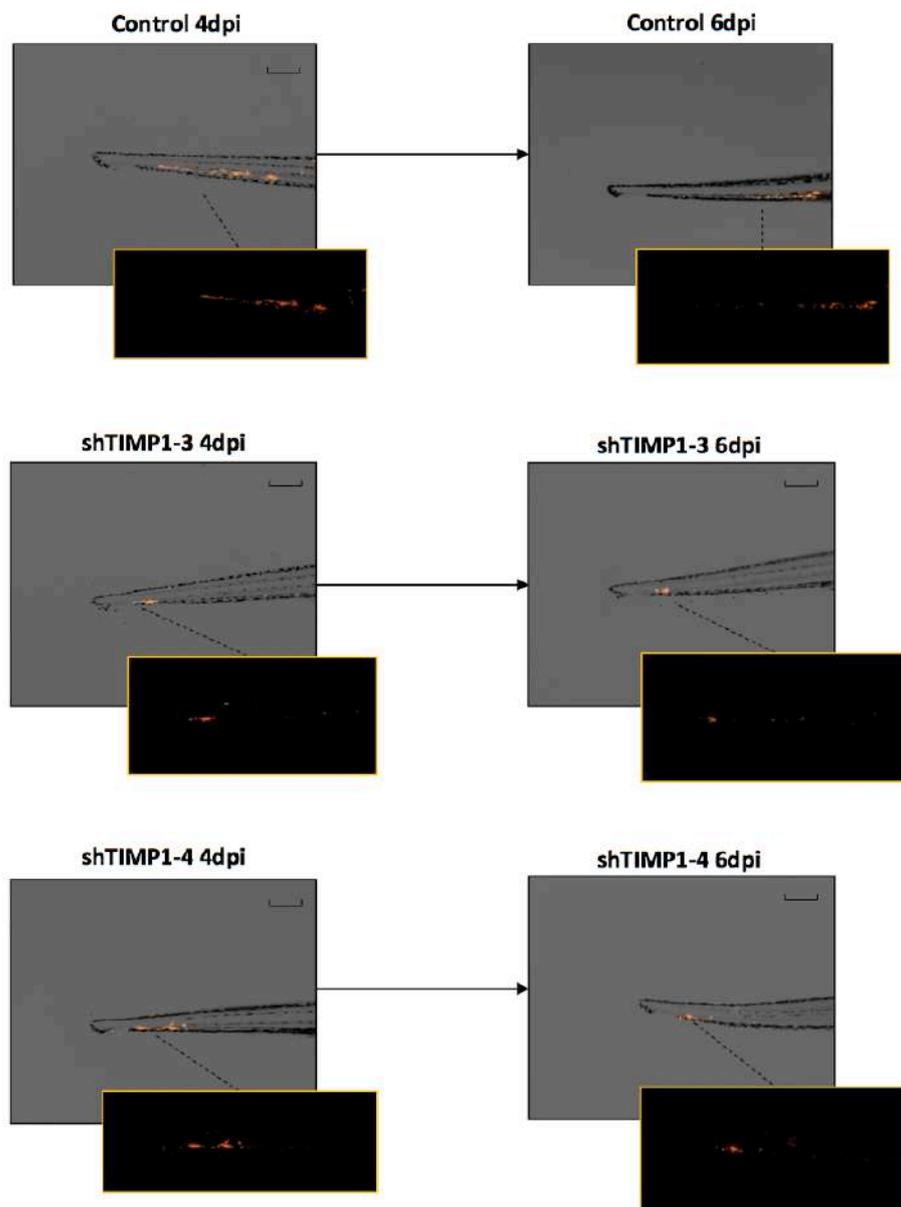


**Figura 47:** Ensayos funcionales *in vitro* con las líneas shTIMP1\_3, shTIMP1\_4 y PLKO. A, Ensayo de proliferación (Fluorescencia Alamar Blue). B, Ensayo de formación de colonias (Fluorescencia Alamar Blue). C, Ensayo de migración (Fluorescencia Calceína). D ensayo de adhesión a colágeno. (Test de Mann-Whitney; \* $p < 0,05$ ).  $n_{\text{replica}}$  (A, B, C) = 6 replicados,  $n_{\text{total}} = 5$  ensayos.  $n_{\text{replica}}$  (D) = 4 replicados,  $n_{\text{total}} = 3$  ensayos.

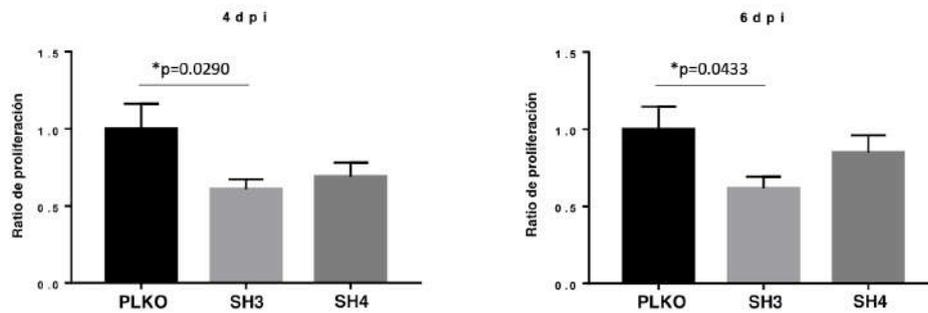
#### 4.2.3.4 Impacto del silenciamiento de TIMP1 en la proliferación de la línea SKOV3 en pez cebra

Las células de cáncer de ovario SKOV3\_PLKO y sus respectivos silenciamientos shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4 se inyectaron en la circulación (Ducto de Cuvier) de los embriones de pez cebra a las 48 hpf y se incubaron durante 6 días después de la inyección a 34°C para poder analizar la proliferación de las distintas líneas en la región del tejido hematopoyético caudal del embrión. Se tomaron imágenes de los embriones a 1, 4 y 6 dpi, observándose una disminución de proliferación del 40% y 10% en las líneas shTIMP1\_3 y shTIMP1\_4, respectivamente (Figura 48 y 49). La disminución fue estadísticamente significativa en la línea shTIMP1\_3. Estos resultados ratifican “*in vivo*” que el bloqueo de TIMP1 en la línea SKOV3 reduce su capacidad proliferativa.

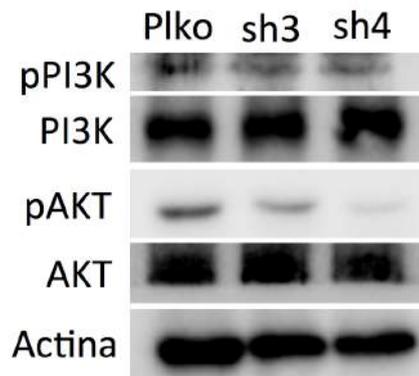
Por otra parte, se comprobó que tras el silenciamiento de TIMP1 se observó un descenso en pAKT y también un ligero descenso en pPI3K mostrando la implicación, en esta línea celular, de TIMP1 en esta vía (Figura 50). Lo que concuerda con lo descrito en otros tipos de tumores (Forte et al., 2017; G. Song et al., 2016).



**Figura 48:** Proliferación de las líneas SKOV3 shTIMP1\_3, shTIMP1\_4 y PLKO (marcadas con DiI) en pez cebra. Imágenes representativas de los embriones inyectados en las diferentes condiciones de la línea celular comparando 4dpi (4 días post-inyección) y 6dpi (6dpi, 6 días post-inyección).



**Figura 49:** Proliferación de las líneas SKOV3 shTIMP1\_3, shTIMP1\_4 y PLKO en pez cebra. Crecimiento tumoral normalizado ( $n_{\text{replica}} = 15$  embriones/condición,  $n_{\text{total}} = 45$  embriones/condición; 4dpi, 4 días post-inyección; 6dpi, 6 días post-inyección; T-Test;  $*p < 0.05$ ).



**Figura 50:** Análisis mediante western blot mostrando la expresión protéica de AKT total, pAKT, PI3K total y pPI3K en las líneas SKOV3 shTIMP1\_3, shTIMP1\_4 y PLKO.





# **DISCUSIÓN**



## 5-DISCUSIÓN

La diseminación hematológica de las células tumorales y la posterior formación de metástasis en órganos distantes, representa la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (Jansson et al., 2016). Las CTCs son la principal causa de la aparición de micrometástasis que finalmente dan lugar a las metástasis a distancia macroscópica (Boral et al., 2017; Christine L. Chaffer, 2011). En los últimos años, se han acumulado evidencias de la relevancia pronóstica de estas células en diferentes tipos de tumores como los de mama, colorrectal, melanoma, pulmón y próstata, entre otros (Mocellin, Hoon, Ambrosi, Nitti, & Rossi, 2006; Rahbari et al., 2010; Liling Zhang et al., 2012). Se ha descrito también que las CTCs presentan características moleculares especiales, que son claves para la formación de lesiones metastásicas, y que les permiten llevar a cabo con éxito los procesos de intravasación, supervivencia en circulación y extravasación en localizaciones a distancia (Gupta & Massagué, 2006).

Todas estas características, sumadas a la importancia de poder tener una muestra del tumor no invasiva, que se puede monitorizar a tiempo real durante la evolución de la enfermedad y que permite estudiar en más detalle la presencia de heterogeneidad tumoral y evolución clonal, convierte a esta población tumoral circulante en una herramienta de gran interés para identificar nuevos marcadores pronóstico y mecanismos de progresión tumoral que puedan suponer una nueva vía terapéutica. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos caracterizar la población de CTCs de pacientes con dos tipos de tumores ginecológicos más agresivos, el CMTN y el cáncer de ovario. Con esta aproximación, abordamos estos dos tipos de tumores de una forma menos tradicional, pero más novedosa e informativa a la hora de caracterizar el proceso de diseminación tumoral.

## 5.1 Valor del estudio de CTCs en pacientes con CMTN

Es importante recordar que el cáncer de mama es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres y tiene una tasa de incidencia más alta que cualquier otro tipo tumoral, siendo la enfermedad metastásica la responsable de la mayoría de las muertes en estas pacientes (Galceran et al., 2017). El CMTN es el subtipo con mayor agresividad, con una tasa de formación de metástasis elevada, asociada a una gran heterogeneidad molecular y ausencia de terapias dirigidas eficientes (Saraiva et al., 2017). Por ello, el avance en el conocimiento de la población de CTCs en estas pacientes, aunque es complicado técnicamente debido a dicha heterogeneidad, puede aportar información valiosa para mejorar su manejo clínico. Así pues, para el presente estudio reclutamos una cohorte de pacientes diagnosticadas con CMTN avanzado y localmente avanzado en las que aislamos la población de CTCs EpCAM<sup>+</sup> y las cuantificamos y caracterizamos a nivel transcriptómico y genético.

En esta cohorte de pacientes TN, que incluyeron estadios III y IV, encontramos un porcentaje de positividad (CTCs $\geq$ 1/7,5mL sangre) del 42% tras el análisis con el CellSearch. Destaca que todas las pacientes en las que se identificó la presencia de CTCs mediante esta tecnología presentaban tumores en estadio IV. Por otra parte, mediante el uso un sistema de detección indirecta mediante RT-q-PCR tras el inmunoaislamiento de las CTCs EpCAM<sup>+</sup>, el porcentaje de pacientes donde se detectó la presencia de CTCs llegó al 60%, de las cuales 12 fueron positivas por CellSearch. Este aumento en la capacidad de detección lo podemos asociar a la inclusión de transcritos de CTCs aisladas mediante el inmunoaislamiento manual, que no cumplen los criterios de positividad del CellSearch, bien por una baja expresión de CKs, por presentar morfología anómala o por ser fragmentos de CTCs. En efecto, en este subtipo de cáncer de mama se ha descrito la presencia de CTCs con baja o nula expresión de CKs que el CellSearch no identifica (Lu Xu et al., 2018).

Es importante destacar que durante la realización del presente estudio se han publicado otros trabajos en los que también monitorizó la población de CTCs en pacientes con CMTN. Los porcentajes de detección de CTCs descritos en estos estudios varían de entre un 16% y un 73% dependiendo de los métodos de análisis empleados y del estadio tumoral (Lu et al., 2016; Y. Zhang et al., 2017). Así, por ejemplo, Zhang y colaboradores, en un estudio publicado en el año 2017, analizaron los niveles de CTCs peri-operatorios mediante la tecnología CellSearch en 286 casos de CMTN con estadios I-III, encontrando CTCs en el 23%, 37% y 56%, respectivamente para cada estadio. En otro estudio publicado en 2015 se analizó una cohorte de 102 pacientes con CMTN en estadio IV con el sistema CellSearch y con una estrategia de cuantificación indirecta tras el inmunoaislamiento de las CTCs EpCAM<sup>+</sup>. En este estudio describieron ratios de detección (CTCs $\geq$ 5/7,5ml de sangre) mediante la tecnología CellSearch del 44% antes de iniciar el tratamiento de quimioterapia y un 33% a los 15 días de iniciar el tratamiento (Magbanua et al., 2015). Con el otro sistema de cuantificación la detección a nivel basal ( $\geq$  0,67CTCs/mL) fue del 33% y del 34% a los 15 días. Teniendo en cuenta estos datos podemos decir que el porcentaje de detección de CTCs mediante la tecnología CellSearch en nuestra cohorte de pacientes fue similar a la descrita en otros estudios, sin embargo, con nuestra estrategia de cuantificación indirecta en ratio de detección mejora considerablemente.

En cuanto al impacto clínico de la presencia de CTCs, Iwata y colaboradores describieron que dentro de las pacientes con tumores de mama, las que presentaban tumores TN y positividad para CTCs eran las que tenían un peor pronóstico (Iwata et al., 2017). Se ha descrito también que la presencia de CTCs y *clusters* de CTCs en tumores de mama y, en concreto en tumores de mama TN, se asocia con peor pronóstico en términos de SG y SLP (Bulfony et al., 2016; Jansson et al., 2016; Lu et al., 2016), datos que concuerdan con los de la cohorte de pacientes del presente estudio, ya que en las pacientes con CTCs $\geq$ 5/7,5 ml de sangre, se observó menores tasas de SG y SLP (reducción de 20 y 16 meses, respectivamente) que en pacientes con

CTCs <5/7,5 ml de sangre. Por otro lado, las pacientes en las que se detectaron *clusters* de CTCs vivieron de media 23 meses menos que las que no presentaron estas agrupaciones. Con respecto a nuestra estrategia de cuantificación alternativa, es importante indicar que en nuestra cohorte de pacientes, las que presentaron alta expresión de *GAPDH* (marcador que utilizamos para determinar el grado de celularidad) en la fracción de CTCs mostraron también un peor pronóstico tanto en SG como en SLP.

Además de permitirnos cuantificar de forma indirecta la presencia de CTCs, la estrategia basada en la combinación del inmunoaislamiento positivo de CTCs y el análisis de expresión de distintos genes nos proporcionó una herramienta de gran valor para caracterizar molecularmente esta población circulante. De hecho, nuestro grupo ha utilizado esta estrategia en otras ocasiones con el fin de caracterizar la población de CTCs presente en pacientes con otros tipos de cáncer, obteniendo información muy valiosa sobre los mecanismos que subyacen la progresión y la diseminación tumoral (Alonso-alconada et al., 2014; Barbazán et al., 2012; León-Mateos et al., 2017; Mariscal et al., 2016).

Teniendo en cuenta que los tumores TN se caracterizan, dentro de su gran heterogeneidad, por presentar expresión de marcadores mesenquimales y asociados a fenotipo de célula madre, que se vinculan directamente a una mayor agresividad (Nieto, Huang, Jackson, & Thiery, 2016) decidimos analizar una firma de marcadores muy asociados a dicha plasticidad celular. Así, en las muestras enriquecidas en CTCs EpCAM<sup>+</sup> de las pacientes se analizó un panel de genes previamente relacionados con plasticidad celular y una mayor agresividad de este tipo tumoral (Dent et al., 2007; Nieto et al., 2016; Sarrió et al., 2008). Tras el análisis de expresión se observó que la población de CTCs EpCAM<sup>+</sup> se caracterizaba por la presencia de marcadores epiteliales como *EPCAM* y *CDH1*, marcadores asociados a un fenotipo más mesenquimal como *VIM*, *SNAIL1* o *TIMP1*, marcadores de célula madre como *CD44*, *CD49F*, *EPCAM*, *ALDH2*, *BCL11A* y *CRIPTO1* y genes relacionados con mecanismos de

regulación hormonales como el *AR*. Estos 11 marcadores presentes en la población de CTCs mostraron una importante capacidad para discriminar pacientes de controles. Este valor diagnóstico fue incluso mayor combinando varios marcadores, siendo la firma formada por *TIMP1*, *SNAIL1* y *BCL11A* la que permitió clasificar como positivos para CTCs a un mayor número de pacientes. Con esta estrategia, además, no solamente fuimos capaces de detectar la presencia de CTCs en pacientes con metástasis a distancia, sino que en pacientes con solo afectación ganglionar somos capaces de detectar estas células, demostrando el valor añadido de esta estrategia de análisis multi-marcador.

En este sentido es importante destacar que al analizar la expresión del panel de 11 marcadores en el tejido sano y tumoral (tumor primario y/o metástasis) de las pacientes, encontramos que *BCL11A*, *EPCAM*, *CD44*, *CDH1*, *TIMP1* y *SNAIL1* presentaban una expresión significativamente mayor en tejido tumoral respecto al tejido sano, confirmando que la expresión de estos marcadores se encuentra ya alterada en el tejido neoplásico primario y que, dicha alteración se mantiene durante el proceso de diseminación hematógena y en las lesiones metastásicas. En el caso de los marcadores no diferencialmente expresados en tejido, puede que su expresión en la población circulante sea importante para la biología de estas células durante el proceso de diseminación, pero no en la fase de tumor sólido.

Por otro lado, en cuanto al impacto clínico del aislamiento y caracterización transcriptómica de la población de CTCs de la población TN de nuestro estudio es importante destacar que, la presencia de niveles elevados de los 11 marcadores se asoció con peores tasas de supervivencia. En concreto, se observó que las pacientes con niveles altos de expresión de *CD49f*, *ALDH2*, *CD44* y *TIMP1* presentaban tasas significativamente menores de SG, mientras que las pacientes niveles de expresión altos de *CD49f* y *TIMP1* presentaron tiempos de SLP significativamente inferiores que las pacientes que presentaban niveles bajos. Estos 4 marcadores están

asociados a un fenotipo de célula madre y mesenquimal por lo que podemos decir que la presencia de marcadores de plasticidad en la población de CTCs EpCAM<sup>+</sup> se asocia a una peor evolución de las pacientes con CMTN.

Respecto a este fenotipo intermedio o de plasticidad, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la transición de características epiteliales a mesenquimales induce la aparición de propiedades de célula madre en las células tumorales de origen epitelial (Mallini, Lennard, Kirby, & Meeson, 2014; Mladinich, Ruan, & Chan, 2016; Schmidt et al., 2015), siendo estos fenotipos híbridos o intermedios los vinculados a una mayor capacidad metastásica. Este estado intermedio o de plasticidad se considera más habitual que la transición completa de un fenotipo epitelial a mesenquimal. Distintos estudios en los que se ha caracterizado la población tumoral circulante han puesto de manifiesto la aparición de estos fenotipos intermedios, que tienen un claro impacto en la supervivencia y eficiencia de anidamiento de estas células (Alonso-alconada et al., 2014; Barbazán et al., 2012; Fabregat, Malfettone, & Soukupova, 2016; Nieto et al., 2016), tal y como observamos en el presente estudio. En las primeras etapas del proceso de diseminación tumoral es esencial que las células epiteliales adquieran una mayor capacidad migratoria, normalmente asociada a la expresión de marcadores mesenquimales como Vimentina, N-Caderina, Snail, ZEB1 o Twist, entre otros. Durante el proceso de intravasación y migración en el torrente sanguíneo las CTCs tienen que sobrevivir a un ambiente extremadamente adverso, donde tienen que superar la falta de O<sub>2</sub>, evitar la activación de procesos de *anoikis* y el reconocimiento por parte de las células inmunes. De hecho, es frecuente encontrar CTCs apoptóticas como resultado de la presión del microambiente sanguíneo, siendo la presencia de estas células apoptóticas mayor en pacientes con cáncer de mama en estadios localizados, donde la eficiencia de colonización de estas células demuestra ser menor (Stefanovic et al., 2019). Durante esta fase la actividad de marcadores de plasticidad es esencial para la supervivencia de las CTCs a través de la activación de mecanismos de supervivencia y resistencia a compuestos anti-

tumorales (Bao et al., 2013; Kasimir-Bauer et al., 2012; Mitra, Mishra, & Li, 2015), activación de la cascada de coagulación (Mego et al., 2009), la formación de protrusiones citoplasmáticas (Whipple, Cheung, & Martin, 2007) y la formación de agrupaciones celulares cuya migración es más efectiva (Hou et al., 2011) y más esquiva para el reconocimiento de las células inmunes (Akalay et al., 2013; Tripathi et al., 2016).

En nuestro estudio hemos demostrado la convivencia de marcadores de plasticidad en las CTCs de pacientes con CMTN, siendo su papel importante en las distintas fases de evolución de la enfermedad. La expresión de E-Caderina y EpCAM demuestra el origen epitelial de estas células y ha sido previamente descrita en otras cohortes de pacientes TN cuyas CTCs se aislaron utilizando estrategias de aislamiento tanto antígeno dependientes como antígeno independientes (Aaltonen et al., 2017; de Wit et al., 2015). La presencia de estos marcadores parece especialmente importante en las últimas fases de anidamiento en el nicho metastásicos en donde las células tumorales tienen que volver a establecer un nuevo foco tumoral de características similares al original mediante el proceso de MET. Por otro lado, la presencia de *VIM*, *SNAIL1*, *TIMP1*, *CRIP1*, *CD49F*, *ALDH2*, *CD44* y *BCL11A* en las CTCs de nuestra población de TNBC ratifica la importancia de la presencia de marcadores mesenquimales y de célula madre para la supervivencia de estas células en la sangre. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de Vimentina es esencial para incrementar la movilidad de las células tumorales (Barriere et al., 2014). En concreto en CMTN la expresión de esta proteína es mayor que en el resto de los subtipos de cáncer de mama, estando asociada su alta expresión a un fenotipo más agresivo dentro de los tumores TN (Yamashita et al., 2013). En este mismo sentido, se ha descrito la sobreexpresión de *SNAIL1*, uno de los reguladores de EMT más relevantes, en tumores de mama ductales y en tumores de mama TN con un potencial metastásico elevado (Szynglarewicz et al., 2017; Maturi, Morén, Enroth, Heldin, & Moustakas, 2018). Por otra parte, con el silenciamiento de *SNAIL1* en células tumorales de vejiga transplantadas de forma ortotópica en un

modelo murino se consiguió bloquear la liberación de CTCs y la aparición de metástasis regionales y a distancia, demostrando la relevancia de este factor de transcripción para la diseminación hematológica (Roth et al., 2017). Otra molécula menos conocida pero que también ha demostrado tener un papel importante para la promoción de EMT en tumores de mama es *TIMP1*. Esta molécula inhibe la actividad de metaloproteasas de matriz, pero, además participa en la modulación de la proliferación y apoptosis celular de forma independiente (Egea et al., 2012; Würtz, Schrohl, Mouridsen, & Brünner, 2008). En cáncer de mama se ha demostrado que la sobreexpresión de este inhibidor potencia la aparición de un fenotipo mesenquimal con aumento de expresión de Vimentina y otros marcadores mesenquimales (Rosemarie Chirco D'Angelo et al., 2014). Globalmente, la expresión de estos tres genes en la población de CTCs de nuestra cohorte de pacientes con CMTN evidencia que han adquirido características más mesenquimales que van a favorecer su llegada al torrente circulatorio y supervivencia en circulación.

Como ya se ha mencionado, la presencia de estos marcadores asociados a la conversión epitelio-mesénquima en la población de las pacientes se acompañó de la expresión de genes vinculados a características de célula madre como *CD44*, *ALDH2*, *CD49F*, *CRIP1* y *BCL11*. El receptor de membrana *CD44* se encuentra altamente expresado en varios tipos de cáncer, incluyendo tumores de mama, regulando la migración celular y la metástasis, mediante su interacción con diferentes tipos de matriz extracelular (Senbanjo & Chellaiah, 2017). Pero sobre todo se conoce como un marcador presente en células tumorales con características *stem*. Está descrito que la alta expresión de *CD44* en tejido tumoral de pacientes con CMTN se encuentra asociada a un peor pronóstico (Collina et al., 2015; Idowu et al., 2012; O'Connor, Chen, González, Cao, & Peng, 2018), tal y como observamos en nuestro estudio en la población de CTCs. En otro estudio publicado recientemente en pacientes con distintos subtipos de cáncer de mama, la alta expresión de este marcador en la población tumoral circulante se asoció a tumores con

mayor afectación metastásica y peores tasas de supervivencia (Markiewicz et al., 2019). Otra molécula de membrana que encontramos caracterizando la población de CTCs de pacientes con CMTN fue la integrina  $\alpha 6$ , también conocida como CD49F, uno de los marcadores más representados en distintas poblaciones de células madre, incluyendo células madre tumorales. Así, por ejemplo, recientemente se ha descrito su importante papel en la renovación de las células madre pluripotentes en tumores de mama y glioblastoma (Krebsbach & Villa-Diaz, 2017). Por otra parte, Gomez-Miragaya y colaboradores han descrito en un modelo PDX murino de CMTN, que tras el tratamiento con taxanos la población CD49F positiva se ve enriquecida debido a su resistencia a este tipo de agentes antitumorales (Gomez-Miragaya & González-Suárez, 2017), indicando su papel como marcador de resistencia. Asimismo, se ha descrito que las pacientes con tumores de mama con presencia de células EPCAM/CD49F<sup>+</sup> presentan una mayor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia tras cirugía, asociándose con un peor pronóstico tanto en SLP como en SG (Ye et al., 2015).

Otra molécula claramente asociada a características de células madre que encontramos expresada en nuestra cohorte de pacientes fue ALDH2. Las aldehído-deshidrogenasas son de gran importancia para el mantenimiento y la diferenciación de las células madre y para el desarrollo embrionario normal. Existen claras evidencias de que su expresión se ve incrementada en respuesta a tratamiento y que promueve fenómenos de quimio-resistencia en células madre tumorales (Clark & Palle, 2016). Finalmente, otras dos moléculas, CRIPTO1 y BCL11A, se encontraron diferencialmente expresadas en nuestra cohorte de pacientes. Ambas moléculas tienen un papel importante en la inducción y mantenimiento de características de células madre. Castro y colaboradores han descrito que CRIPTO1 se encuentra expresada en ciertas áreas tumorales en pacientes con TNBC y que su promotor se encuentra activo en el tumor primario. Tras su silenciamiento mediante CRISPR-Cas9 en células de CMTN y su trasplante ortotópico en un modelo murino se describió un descenso en la tasa de crecimiento tumoral y de la aparición de

metástasis pulmonares (Castro et al., 2015). Por otra parte, esta descrito que el silenciamiento de CRIPTO1 reduce la proliferación *in vitro* e *in vivo* en distintas líneas tumorales (Strizzi et al., 2008). El gen BCL11A codifica para una proteína de dedos de zinc (C2H2) que actúa como factor de transcripción, que fue inicialmente descubierta en modelos murinos de leucemia mieloide y que posteriormente se ha visto que se encuentra sobre-expresada en algunos casos de linfomas de células B causados por translocaciones cromosómicas (T. Nakamura, Largaespada, Shaughnessy, Jenkins, & Copeland, 1996; Satterwhite et al., 2001). Khaled y colaboradores describieron en el año 2015 que BCL11A se encuentra sobre-expresada en CMTN, promoviendo el desarrollo tumoral (Khaled et al., 2015). Es importante destacar que en ratones *knock-down* para BCL11A se ve reducido el número de células madre y células progenitoras en el epitelio mamario, demostrando de este modo el importante papel que juega BCL11A para la adquisición de un fenotipo *stem-like* en CMTN (Khaled et al., 2015).

De forma global, la presencia de todos estos marcadores de plasticidad en las CTCs de las pacientes TN demuestra, por una parte, que la CTCs presentan un perfil de expresión similar al encontrado en tejido tumoral de pacientes con esta patología y, por otra parte, que dicha plasticidad es importante durante el proceso de diseminación tumoral. También pone de manifiesto que es importante contar con marcadores mesenquimales a la hora de aislar la población de CTCs de estas pacientes, aunque en el presente estudio el aislamiento EpCAM positivo nos ha permitido alcanzar ratios de detección muy aceptables, sobre todo al incluir marcadores de plasticidad para la detección de la población tumoral circulante. Además, demostramos que la población de CTCs EpCAM<sup>+</sup> con mayor plasticidad fenotípica se asocia con una peor evolución de la enfermedad, siendo un dato que puede aportar información pronóstica adicional al oncólogo para el manejo clínico de estas pacientes. En este sentido es importante destacar que ninguna variable clínica de las que se analizaron en el presente estudio mostraron tener valor pronóstico en nuestra cohorte

de pacientes, probablemente por ser una cohorte clínicamente muy heterogénea y el tamaño muestral limitado.

Por otro lado, uno de los objetivos del presente trabajo fue la identificación de potenciales dianas terapéuticas a través de la caracterización de las CTCs de las pacientes TN. Para ello, de la firma de marcadores presentes en esta población circulante seleccionamos dos de ellos, el AR y TIMP1, para una mayor caracterización mediante estudios funcionales *in vitro* e *in vivo*. Su selección se basó en el interés de ambos como vías de tratamiento con fármacos o moléculas activas que podrían llegar a constituir una verdadera alternativa terapéutica en pacientes con CMTN.

Sobre el receptor de andrógenos cabe destacar que actúa como factor de transcripción de numerosos genes tras la unión a andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona). Este receptor se encuentra sobre-expresado en el 12%-36% de los tumores de mama TN (Collins et al., 2011; Mrklič, Pogorelić, Capkun, & Tomić, 2013; Thike et al., 2014), denominados LAR (subtipo luminal con expresión del AR). Dicha expresión parece ser un factor predictivo de la mala respuesta a quimioterapia basada en taxanos y antraciclinas, ya que los pacientes con alta expresión presentan los ratios más bajos de respuesta completa en comparación con el resto de tumores de mama TN (Masuda et al., 2013; Park et al., 2010; Telli et al., 2016). Por otra parte, la expresión del receptor de andrógenos puede ser considerada un marcador predictivo de respuesta a terapia anti-androgénica, administrada de forma habitual para el tratamiento de los tumores de próstata. Existen dos vías principales para el bloqueo de la estimulación androgénica; el uso de antagonistas que bloquean la activación del receptor o el bloqueo de la síntesis de andrógenos. Varios estudios preclínicos demostraron la sensibilidad de líneas celulares LAR al boqueo androgénico (Astvatsaturyan, Yue, Walts, & Bose, 2018; Lehmann et al., 2011). Asimismo, en modelos *xenograft* murinos se ha demostrado la efectividad del uso de antagonistas del receptor de andrógenos como la Bicalutamida y la enzalutamida para el tratamiento de este tipo de tumores (Cochrane et al., 2014;

Lehmann et al., 2011). Cabe mencionar, que en la actualidad hay distintos ensayos clínicos en marcha en los que se está combinando el bloqueo de la vía androgénica con otros fármacos en pacientes con tumores TN que sobreexpresan el AR (Mina, Yoder, & Sharma, 2017). Es importante destacar también, que en un estudio muy reciente, se ha descrito la asociación entre la presencia de CTC positivas para AR y la formación de metástasis óseas en pacientes con tumores de mama (Aceto et al., 2018).

Aunque el interés como diana terapéutica de este receptor en tumores con alta expresión del AR (LAR) está plenamente aceptado, su papel en el resto de tumores TN está poco explorado. Por ello, en el presente trabajo realizamos estudios funcionales utilizando como modelo celular la línea de CMTN MDA-MB 231, que tiene una expresión media del receptor y representa mejor el fenotipo de la mayor parte de los tumores TN. Para bloquear la vía androgénica en estos ensayos utilizamos los inhibidores de la vía androgénica abiraterona y enzalutamida. Como ya se comentó en el apartado de resultados, la abiraterona bloquea la actividad de la enzima CYP17, esencial para la síntesis de andrógenos (Norris et al., 2017), mientras que la enzalutamida (Tucci et al., 2018) actúa como antagonista de los andrógenos bloqueando la activación del receptor. Tras el tratamiento *in vitro* con estos dos compuestos, observamos un descenso en la capacidad proliferativa en condiciones de adherencia en placa y en la capacidad de formación de colonias en agar en respuesta al tratamiento con abiraterona, sin embargo, el tratamiento con dichos compuestos no tuvo impacto en la capacidad de migración de la línea celular. Además de los ensayos *in vitro*, en el presente trabajo hemos utilizado un modelo *xenograft* en pez cebra con el fin de analizar *in vivo* el impacto de la inhibición de la vía androgénica. En este modelo tanto el tratamiento con enzalutamida como con abiraterona mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral. La capacidad para estimular la proliferación celular mediada por AR ha sido descrita en distintos tipos de tumores, principalmente en tumores de próstata, aunque estudios publicados recientemente han descrito esta estimulación de la proliferación en tumores de mama y, en concreto,

en tumores de mama TN (Giovannelli et al., 2018; Shen et al., 2017). En cáncer de próstata esta actividad promotora de la proliferación celular se asocia a la activación de la vía de señalización PI3K/AKT/ERK, aunque el AR puede presentar una función reguladora de la proliferación directa actuando como factor de transcripción (Liao et al., 2013; Mikhailova et al., 2008). Así, por ejemplo, se ha descrito que en líneas celulares de cáncer de mama ER<sup>-</sup>AR<sup>+</sup> la estimulación conjunta de EGFR y AR desencadena una hiperestimulación de la vía MAPK, aumentando de forma significativa su tasa proliferativa (Garay et al., 2012; Lange, Gioeli, Hammes, & Marker, 2007). También se ha descrito la interacción entre el AR y la vía WNT en líneas tumorales luminales, mediante el aumento de los niveles de transcripción de WNT7B, que causan la activación de  $\beta$ -catenina. La translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina activa la transcripción de Her3 que tiene como consecuencia la estimulación de PI3K/AKT (Ni et al., 2011).

En nuestro estudio no hemos explorado los mecanismos moleculares que se ven alterados en la línea MDA-231MB y que hacen que se inhiba proliferación con el bloqueo farmacológico de la vía androgénica, pero con nuestros resultados reforzamos el interés terapéutico de esta vía para el tratamiento de TN con expresión del AR, siendo la población de CTCs una herramienta muy importante para determinar el estado de este receptor en pacientes metastásicos. Un estudio reciente realizado en pacientes con cáncer de mama metastásico con distinta histología determinó que un 31% de las pacientes presentaban alguna CTC positiva para AR. En este estudio tuvieron la oportunidad de comparar el resultado obtenido en la población de CTCs y el tumor primario, encontrando un 58% de casos discordantes con adquisición o pérdida de expresión en la población tumoral circulante, que estaría representando también a las localizaciones tumorales distales (de Kruijff et al., 2019). Estos datos refuerzan el valor añadido que presenta el análisis de este receptor en la población de CTCs, y que en cáncer de próstata está mucho más avanzado y validado (Antonarakis et al., 2017; Dehm, Montgomery, & Plymate, 2019).

El otro marcador, presente en la población de CTCs de pacientes con CMTN que seleccionamos para caracterizar su implicación en la biología de estos tumores fue TIMP1. Esta proteína fue identificada hace dos décadas e inicialmente caracterizada como un inhibidor de MMPs (metaloproteinasas de matriz) endógeno (Docherty et al., n.d.; Greene et al., 1996; Pavloff, Staskus, Kishnani, & Hawkesq, 1992; Stetler-stevenson, Kruttsch, & Liotta, 1989), siendo reconocido durante mucho tiempo por su papel en la remodelación de la matriz extracelular (Murphy & Nagase, 2008). Las MMPs y sus inhibidores tisulares (TIMPs) son controladores de la dinámica de remodelación de la matriz extracelular. Se ha demostrado que la expresión de ambas familias de proteínas se encuentra alterada tanto en tumores benignos como malignos, ya que el proceso de invasión y metástasis requiere de la descomposición y eliminación de matriz extracelular (Schröpfer et al., 2010). En concreto, la sobre-expresión de TIMP1 se ha descrito en distintos tipos de cáncer humanos, incluyendo el cáncer de próstata (Oh et al., 2011), cáncer de pulmón (Gouyer et al., 2005), melanoma (Kluger et al., 2011), glioblastoma (Aaberg-Jessen et al., 2009) y el cáncer de mama (Ree et al., 1997; Yoshiji, Gomez, & Thorgeirsson, 1996). En tejido de CMTN esta molécula se encuentra también sobre-expresada, tal y como hemos visto en nuestro estudio y han descrito otros trabajos, indicando su alta expresión un peor pronóstico de la enfermedad (G. Cheng et al., 2016). Sin embargo, a pesar de que TIMP1 ha sido descrito como una interesante diana terapéutica en varios tipos de tumores, debido a su papel como inhibidor de MMP9 y también por su papel como promotor de la proliferación y la angiogénesis, su implicación en la diseminación y progresión del CMTN no está bien definida.

Para comprender mejor dicho papel en nuestro estudio empleamos de nuevo como modelo celular la línea MDA-MB 231 y bloqueamos la expresión de TIMP1 mediante técnicas de shRNA. Tras el silenciamiento observamos un descenso en la expresión de marcadores N-caderina y un aumento de E-caderina, sugiriendo una posible implicación de TIMP1 en la regulación del proceso de EMT en CMTN, tal y como ya ha sido descrito en otros subtipo de tumores

de mama (R. C. D'Angelo et al., 2014). En concreto, en este estudio se demostró que TIMP1 estimula la expresión del factor de transcripción Twist1 y esto tiene como consecuencia una reducción de los niveles de E-caderina, en consonancia con nuestros resultados. Este fenotipo más epitelial no se tradujo en una menor capacidad de migración de las células silenciadas *in vitro*, pero si observamos una reducción en la capacidad proliferativa y de formación de colonias en agar junto con un aumento de la capacidad de adhesión a colágeno. Esta reducción se observó también *in vivo* utilizando dos modelos diferentes, *xenograft* de pez cebra y un modelo ortotópico murino.

Respecto a estos resultados es importante destacar que proliferación mediada por TIMP1 ha sido descrita con anterioridad en varios tipos de tumores como los de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, leucemias y recientemente en cáncer de mama TN (G. Cheng et al., 2016; Forte et al., 2017; G. Li, Fridman, & Kim, 1999; Omar et al., 2018; G. Song et al., 2016). Existen diferentes hipótesis que explican la mediación de TIMP1 en proliferación y se cree que esta actividad es independiente de la regulación de las MMPs. En algunos estudios esta actividad se ha asociado con la activación de la vía de PI3K/AKT y con la inhibición de la muerte celular (Forte et al., 2017; G. Song et al., 2016). Por otra parte, aunque la actividad anti-apoptótica de TIMP1 en otro tipo de tumores está plenamente demostrada, los estudios sobre el efecto de TIMP1 sobre el crecimiento celular en cáncer de mama han desvelado resultados contradictorios (Chromek, Tullus, Lundahl, & Brauner, 2004; Guedez et al., 1998; Porter, Shen, & Denhardt, 2004; Taube, Liu, Fridman, & Kim, 2006; Vorotnikova, Tries, & Braunhut, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que TIMP1 promueve el crecimiento celular en la línea celular de tejido epitelial de mama normal MCF-10A, manteniendo las células en fase M, al aumentar los niveles de la proteína ciclina D1 (G. Cheng et al., 2016; Taube et al., 2006). Pero también se ha publicado que en ratones TIMP1 deficientes la proliferación celular epitelial mamaria se encuentra aumentada (Fata, Leco, Moorehead, Martin, & Khokha, 1999). Por otro lado, en la línea celular de CMTN MDA-MB-435 se ha descrito que TIMP1 promueve el crecimiento

celular activando MEK, p38 y en menor medida PI3K (Porter et al., 2004) y que el bloqueo de TIMP1 en las líneas celulares de CMTN, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 inhibe el crecimiento celular *in vitro* induciendo la parada del ciclo celular en fase G1, bajando los niveles de la ciclina D1 (G. Cheng et al., 2016). En nuestro estudio se analizó el grado de activación de PI3K y AKT en respuesta al bloqueo de TIMP1 sin observar diferencias entre la línea MDA-MB-231 control y las silenciadas, por lo que, en nuestro modelo celular, esta vía no parece ser la responsable directa del descenso de capacidad proliferativa, pudiendo ser suficiente la inhibición mediada por ciclina D1, previamente descrita por otros autores. Asimismo, en la línea celular canina MDCK se ha descrito que la inhibición de TIMP1 facilita la activación de fenómenos de apoptosis asociados a una disminución de la capacidad de adhesión en placa y a colágeno, contrariamente a lo que observamos en nuestro estudio en los ensayos de adhesión (Hellman et al., 2008). Como uno de los principales remodeladores de la matriz extracelular, es bien conocida la importancia de TIMP1 para el equilibrio de la síntesis de colágeno en los tejidos (Kuroda et al., 2019), pero no se ha descrito ningún mecanismo específico que esté regulando la adhesión a dicho sustrato, a mayores de su implicación en EMT, que indirectamente puede estar modulando la adquisición de un fenotipo más o menos adhesivo a distintos sustratos.

Por otra parte, es muy importante remarcar que en modelo ortotópico murino que empleamos en el presente estudio para determinar el efecto *in vivo* del bloqueo de TIMP1, los tumores de los ratones inyectados con las células control desarrollaron metástasis pulmonares en la totalidad de los casos, mientras que en ninguno de los ratones inyectados con las células silenciadas aparecieron metástasis pulmonares. Esto significa que inhibiendo la actividad de TIMP1 conseguimos que el proceso de diseminación sea menos efectivo. Este efecto en el proceso de diseminación podría estar vinculado a la pérdida de capacidad de remodelación de la matriz extracelular y de interacción con el microambiente, previamente descrito en otros tipos tumorales (Ries, 2014). La reducción de N-

caderina y aumento de E-cadherina observada tras el silenciamiento de TIMP1 podría explicar en parte, la pérdida de capacidad metastásica de las líneas silenciadas. Tal y como ya se comentó, la pérdida de E-caderina y el aumento de N-caderina está claramente asociada a un aumento de la invasividad de las células tumorales (Nieto, 2011). La presencia de E-caderina es necesaria para mantener la cohesión de las células que forman los tumores primarios y prevenir la migración individual éstas (Shamir et al., 2014). Así, la pérdida de expresión de esta proteína, unida al aumento de N-caderina, se ha asociado claramente a una mayor capacidad de generar metástasis en tumores de mama (Hazan, Phillips, Qiao, Norton, & Aaronson, 2000). Todo ello concuerda con lo observado en nuestro modelo murino. Por otra parte, se ha descrito que TIMP1 media la sinergia entre las células tumorales y los fibroblastos asociados a células tumorales que favorece la progresión tumoral (Gong et al., 2013), por lo que su bloqueo podría estar inhibiendo también procesos de migración colectiva que son importantes para la generación de metástasis en tumores de mama (Cheung & Ewald, 2014).

Finalmente, como este receptor intracelular se ha asociado al desarrollo de resistencias frente a distintas terapias anti-tumorales como la Gemcitabina en cáncer de páncreas (D'Costa et al., 2017), quisimos determinar si está implicado en la respuesta a los tratamientos de quimioterapia que habitualmente reciben las pacientes con tumores TN. Para ello hicimos ensayos de citotoxicidad con carboplatino y paclitaxel, en los que no se observó ninguna diferencia en respuesta al tratamiento en las líneas silenciadas, aunque teniendo en cuenta que las líneas silenciadas presentaron una menor tasa proliferativa si esperábamos observar algún efecto.

Finalmente, para completar la caracterización de la población de CTCs en pacientes con CMTN llevamos a cabo un estudio para caracterizar el perfil genético de esta población circulante y ponerlo en relación con el presente en tejido primario y/o metastásico. Para ello nos planteamos realizar dicho estudio a nivel de *single* CTCs para poder abarcar mejor la heterogeneidad de la población circulante.

En cuanto a los estudios de *single cell* o célula única en oncología, es importante destacar que el método de análisis tradicional de los tumores, donde se analiza un fragmento de tejido, puede llevar a la pérdida de información debido a que ciertas características moleculares pueden verse enmascaradas por este tipo de análisis conjunto. La secuenciación de genoma a nivel de célula única, permite estudiar la heterogeneidad intra-tumoral presente en la muestra y abre una oportunidad para determinar cuales son las propiedades moleculares clave que están influyendo en el avance de la enfermedad (Rantalainen, 2018). Poder abarcar mejor la heterogeneidad tumoral tiene claras implicaciones en el manejo clínico de los pacientes. La primera es que puede facilitar la clasificación molecular diagnóstica de los tumores de la que depende muchas veces la selección terapéutica. Y, por otro lado, nos puede dar información sobre que tumores van a ser más resistentes a terapia, ya que tumores con mayor heterogeneidad tumoral suelen tener menores tiempos de respuesta a terapia y actualmente las terapias no están diseñadas para abordar dicha heterogeneidad (Heymann & Téllez-Gabriel, n.d.). Asimismo, los análisis de CTCs a nivel de célula única han demostrado que es factible analizar de forma dinámica la evolución clonal del tumor y también la adquisición de mecanismos de resistencia a tratamiento (Heitzer et al., 2013; Rantalainen, 2018; J. Yin et al., 2019), permitiendo monitorizar de una forma no invasiva el curso de la enfermedad y la administración de la terapia más beneficiosa para el paciente en cada momento y caso concretos. A pesar de su elevado interés existen dos obstáculos principales que han determinado que este tipo de estudios no se hayan podido llevar a cabo hasta hace pocos años. El primer problema para caracterizar la población de CTCs a nivel de célula única radica en la baja pureza de las muestras de CTCs, que independientemente de la tecnología de aislamiento, se encuentran habitualmente en un porcentaje bajo respecto a las células sanguíneas aisladas inespecíficamente (Heymann & Téllez-Gabriel, n.d.). El otro problema está en la necesidad de amplificar el genoma de la célula para poder secuenciarlo. Hasta hace poco tiempo la amplificación de genoma completo a partir de una única célula no era factible (Heymann & Téllez-Gabriel, n.d.).

En la actualidad, hay publicados varios estudios de caracterización genómica en de CTCs a nivel de célula única en cáncer de mama en los cuales se muestra la heterogeneidad clonal presente entre las CTCs analizadas, previamente aisladas mediante distintas tecnologías como CellSearch, DEPArray y distintos dispositivos microfluídicos (Paoletti et al., 2018; Pestrin et al., 2015; J. Yin et al., 2019). Babayan y colaboradores, por ejemplo, consiguieron aislar mediante micromanipulación CTCs de muestras enriquecidas mediante gradientes de densidad y llevaron a cabo un estudio de expresión del ER a nivel de CTCs individuales en pacientes con tumores de mama basales, encontrando pacientes ER<sup>+</sup> en tejido y con CTCs ER<sup>+</sup> y ER<sup>-</sup> que explicaban un 20% de los tratamientos anti-ER inefectivos, demostrando que la heterogeneidad de la población tumoral circulante puede ser predictiva de respuesta a terapia (Babayan et al., 2013). También se ha descrito en estudios con CTCs individuales la heterogeneidad del estado mutacional de PIK3CA en el momento del diagnóstico de la enfermedad metastásica y durante la evolución de la misma (Markou et al., 2014; Pestrin et al., 2015). En otro estudio, de Luca y colaboradores analizaron mediante NGS un panel de 50 genes en CTCs con cáncer de mama metastásico combinando para el aislamiento el sistema CellSearch y el sistema DEPArray. Encontraron un total de 51 variantes en 25 genes, demostrando de nuevo la alta heterogeneidad de la población circulante (De Luca et al., 2016). Es importante mencionar también un estudio de Fernández y colaboradores donde estudiaron las mutaciones en TP53 presentes en la CTCs de pacientes con CMTN. En este estudio se observó una gran heterogeneidad de las CTCs intrapaciente, ya que algunas CTCs presentaron la misma mutación en TP53 que el tejido primario, mientras que otras presentaron mutaciones distintas e incluso algunas de ellas presentaron el alelo nativo de este gen supresor de tumores (Fernandez et al., 2014).

En nuestro estudio combinamos el aislamiento con el sistema CellSearch y el posterior análisis con el DEPArray en 8 pacientes metastásica que presentaron un número superior a 10 CTC. Tenemos que destacar en primer lugar que la eficiencia de recuperación tras el

aislamiento con el DEParray fue bastante inferior a lo descrito en otros trabajos (De Luca et al., 2016) por problemas eficiencia del equipo y el protocolo de trabajo. A pesar de estos problemas, finalmente se pudo hacer un estudio comparativo entre las CTCs y el tejido primario o metastásico de 4 pacientes. Tanto las CTCs como el tejido se analizaron con un panel que abarca 163 genes habitualmente alterados en cáncer. Se pudieron secuenciar un total de 7 CTCs convencionales (CKs<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>) a nivel de célula única, un *cluster* (con una CTC convencional y dos células CKs<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>) y dos grupos de 10 y 12 CTCs convencionales. Tras el análisis de secuenciación se determinaron mutaciones puntuales en *TP53* en las cuatro pacientes, en *PIK3CA* en tres de las pacientes y en *NOTCH2* y en *BRCA2* en dos de las pacientes, bien en CTCs o en tejido tumoral o metastásico. Estas frecuencias de aparición concuerdan bien los datos que hay registrados en tejido en la ATCC para este subtipo tumoral (Pareja et al., 2016).

Es relevante destacar que en general se observó una importante heterogeneidad mutacional presente tanto entre las diferentes CTCs como en los tejidos analizados en cada paciente. En 3 de las pacientes se encontró alguna mutación común entre tejido y CTCs aunque el rango de concordancia fue muy variable, siendo la mayor concordancia encontrada en una paciente del 50%. En la paciente con un 100% de discordancia entre tejido y CTCs, solo se pudo analizar una CTC y la muestra de tejido fue obtenida posteriormente tras haber recibido quimioterapia, por lo que hay varios factores que pueden justificar dicha discordancia, sobre todo el hecho de solo poder analizar una CTC. También es interesante destacar que en el análisis de los *pools* de CTCs apenas se detectaron mutaciones, reforzando la importancia de llevar a cabo los estudios genómicos a nivel de célula individual en las que la representación de las variantes va a ser suficientemente alta como para ser detectada. Asimismo, el estudio a nivel de célula individual nos permitió determinar el origen tumoral de una célula con claro doble marcaje para CD45<sup>+</sup> y CKs<sup>+</sup>, que por expresar CD45 no cumplía los criterios de aceptados para definir una CTCs. La presencia de células con doble marcaje (CD45<sup>+</sup> y CKs<sup>+</sup>) ha

sido descrita previamente y su origen no está claro, se especula tanto con motivos de inespecificidad de marcaje como con la adquisición de expresión de marcadores sanguíneos por parte de las células tumorales (Muinelo et al., 2014).

Globalmente los resultados de este estudio de secuenciación refuerzan la ya descrita heterogeneidad intra-tumoral que caracteriza al CMTN (Clinicopathologic & Features, 2014; Madic et al., 2014) y representan una vía para el estudio de las principales características moleculares que guían el curso de la enfermedad, permitiendo mejorar y adecuar tanto la monitorización como el tratamiento en pacientes con CMTN.

## **5.2 Valor del estudio de CTCs en pacientes con cáncer de ovario**

En el presente trabajo, además de intentar comprender mejor los mecanismos de progresión tumoral y diseminación en pacientes con CMTN, hemos querido utilizar una aproximación similar para avanzar en el conocimiento del tumor ginecológico con mayor tasa de mortalidad, el cáncer de ovario (Abuidris et al., 2016; Coburn, Bray, Sherman, & Trabert, 2017). Para ello hemos aplicado la misma estrategia de cuantificación y análisis de población tumoral circulante a una cohorte de 38 pacientes con cáncer de ovario avanzado.

Estudios previos han descrito la presencia de CTCs en pacientes con cáncer de ovario aunque su frecuencia es menor que en otros tumores sólidos (S. Liu et al., 2013; Obermayr et al., 2010; Poveda et al., 2011). Estos ratios de detección de CTCs varían entre el 18% y 88% en tumores con estadio FIGO I-IV dependiendo del método de detección utilizado (Y. Zhou et al., 2015). La baja tasa de detección descrita en algunos trabajos se explica por el hecho de que los tumores de ovario presentan una menor diseminación hematógena (Pradeep et al., 2014) y por lo tanto la sensibilidad del aislamiento y la estrategia de detección aplicada para capturar dichas células en cáncer de ovario ha de ser muy alta.

En el presente estudio mediante el uso del sistema CellSearch encontramos CTCs en un 21% de las pacientes, en un rango de 1 a 8 CTCs, presentando la mayoría de las pacientes con positividad para CTCs enfermedad extra-peritoneal. Sin embargo, al igual que pasó en la cohorte de pacientes con CMTN, tras el inmunoaislamiento de la población EpCAM<sup>+</sup> y su posterior cuantificación indirecta analizando la expresión de distintos marcadores llegamos a detectar la presencia de enfermedad diseminada en un a población mayor (63% de las pacientes). Dentro de la firma analizada en la población de CTCs, incluimos, de nuevo, marcadores generales de plasticidad celular y genes que están frecuentemente aumentados en tumores de ovario y que median procesos importantes para la progresión de estos tumores. Tras el análisis de expresión determinamos que los genes que estaban caracterizando la población de CTCs en nuestra cohorte de pacientes con cáncer de ovario fueron *GAPDH*, *CK19*, *MUC1*, *CD24*, *CD44*, *TIMP1* y *CXCR4*. Estos seis marcadores de CTCs mostraron un gran potencial para discriminar entre pacientes y controles, que se incrementó generando un modelo combinado con los niveles de *GAPDH*, *TIMP1*, *CK19* y *MUC1*.

Es importante señalar que la expresión de los marcadores epiteliales CK19 y MUC1 ha sido descrita previamente en CTCs de pacientes con cáncer de ovario utilizando estrategias de aislamiento tanto antígeno dependientes como antígeno independientes (Chebouti et al., 2017; Kolostova et al., 2016; J. F. Liu et al., 2013). Por otro lado, la expresión de CD24 y CD44 en la población tumoral circulante concuerda con la idea, que ya se ha explicado de forma detallada previamente, de que habitualmente las CTCs muestran una importante plasticidad molecular que favorece la migración y la supervivencia de estas células bajo la presión de un microambiente adverso (Francart et al., 2018). Recientemente Nakamura y colaboradores han demostrado que CD24 se encuentra altamente expresado en tumores primarios de ovario, correlacionándose su expresión con la presencia de metástasis ganglionares y constituyendo un factor pronóstico independiente (K. Nakamura et al., 2017). Por otra parte, la expresión de CD44 ha sido asociada con tumores de ovario de alto grado y estadios FIGO

avanzados (J. Zhang, Chang, & Liu, 2013). También se ha descrito que la expresión de CD44 en células de ovario incrementa su capacidad de proliferación, adhesión e invasión (M. Mao et al., 2017). La presencia de este receptor, asociado a características de célula madre, se ha observado en CTCs. Así, Gorges y colaboradores describieron su expresión en CTCs de pacientes con cáncer de mama tras la caracterización transcriptómica de estas células a nivel de célula única (Gorges et al., 2016). Por su parte, Blassl y colaboradores analizaron también a nivel de célula única los niveles de transcritos de *CD44* en tres pacientes con cáncer de ovario, encontrando que solamente una parte de las CTCs, las que presentan mayor expresión de marcadores mesenquimales, presentaban expresión de *CD44* (Blassl et al., 2016). Por otra parte, la expresión de *CXCR4* detectada en CTCs de cáncer de ovario refuerza la relevancia de la plasticidad celular para el proceso de diseminación. De hecho, los niveles de expresión de este receptor se encuentran incrementados en los carcinomas serosos de alto grado, el subtipo más metastásico (Figueras et al., 2017). A su vez, las células de cáncer de ovario con mayor expresión de *CXCR4* presentan características más mesenquimales y una mayor capacidad invasiva. En concordancia, la inhibición de *CXCR4* ha sido asociada con una reducción de los niveles de CTCs y de formación de metástasis en modelos murinos de cáncer de ovario (Figueras et al., 2017).

Nuestros resultados han demostrado que TIMP1 se encuentra también caracterizando la población de CTCs de pacientes con cáncer de ovario. Recientemente, Będkowska y colaboradores han descrito niveles altos de TIMP1 en el suero de pacientes con cáncer de ovario en comparación con el suero de controles sanos (Będkowska et al., 2017). Por otro lado, Määttä y colaboradores demostraron analizando 22 casos de tumores de ovario la presencia de este marcador principalmente en tumores serosos y mucinosos (Määttä, Talvensaarimattila, Turpeenniemi-Hujanen, & Santala, 2007). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros estudios donde se determinó el aumento de los niveles circulantes de TIMP1 y MMP9 utilizando plasma de pacientes con esta patología (Manenti et al., 2003). En

relación al valor pronóstico del inhibidor de metaloproteasas se han reportado resultados contradictorios. Algunos estudios no han logrado demostrar el impacto de los niveles tisulares de TIMP1 en supervivencia (Brun et al., 2012; Steffensen et al., 2010) mientras que otros han descrito niveles séricos elevados antes de cirugía o después de tratamiento asociados con pronóstico clínico desfavorable (Mahner et al., 2010; Manenti et al., 2003).

Al igual que hicimos en la parte de este estudio centrada en CMTN, quisimos caracterizar en mayor detalle el papel de TIMP1 en cáncer de ovario. Para ello empleamos como modelo la línea celular SKOV3 y silenciamos la expresión del gen. De nuevo, tal y como pasó en la línea de mama MDA-MB-231, observamos un descenso en la expresión de marcadores mesenquimales, sugiriendo un posible papel de TIMP1 en la regulación del proceso de EMT en cáncer de ovario. Este fenotipo más epitelial no se asoció a una menor capacidad de migración de las células silenciadas, pero sí a una menor capacidad proliferativa en condiciones de adherencia en placa. Esta disminución de la tasa de proliferación se observó también *in vivo* en *xenografts* en pez cebra. Tal y como ya se mencionó la estimulación de la proliferación mediada por TIMP1 ha sido descrita en otros subtipos tumorales como las leucemias, el cáncer de colon, el cáncer gástrico y el de mama (Forte et al., 2017; G. Li et al., 1999; Omar et al., 2018; G. Song et al., 2016), pero nunca hasta ahora en cáncer de ovario. Como ya comentamos, la capacidad de regulación de la proliferación de TIMP1 se considera independiente a su acción sobre las MMPs. En nuestro estudio hemos visto que el silenciamiento de TIMP1 induce un descenso en la activación de la vía de AKT que podría explicar en parte el descenso de la tasa de proliferación en estas células, tal y como se ha descrito en otros tipos de tumores (Forte et al., 2017; G. Song et al., 2016). Este efecto no se observó en las MDA-MB-231, indicando que los mecanismos de regulación de este inhibidor de metaloproteasas puede ser tumor y subtipo específicos. Es interesante mencionar también que el eje CXCR4/SDF1 ha sido descrito como un importante elemento en la inhibición de la apoptosis mediada por TIMP1 (T. Song, Dou, Jia, Tu, & Zheng, 2015) De este modo, la

expresión conjunta de *TIMP1* y *CXCR4* en la CTCs de pacientes con cáncer de ovario puede estar jugando un papel importante inhibiendo la entrada en mecanismos de apoptosis.

A modo de resumen general (Figura 51), con el presente estudio hemos evidenciado que el conteo de CTCs y su caracterización molecular puede aportar información importante para establecer nuevas opciones de diagnóstico, pronóstico y monitorización del CMTN y del cáncer de ovario. Esta aproximación constituye una valiosa herramienta para la identificación de los mecanismos que dirigen la diseminación en este agresivo tipo de tumores. De hecho, encontramos una firma de expresión génica en CTCs de ambos tipos tumorales caracterizada por una fuerte plasticidad celular en términos de EMT y características de célula madre y que puede explicar parte de la biología de estas células centrada en la migración, supervivencia y colonización en ambientes altamente hostiles como el torrente circulatorio. Asimismo, validamos *in vitro* e *in vivo* el papel promotor tumoral de dos de los genes expresados en la población de CTCs de ambas cohortes de pacientes. Así, se determinó la utilidad del bloqueo de la vía que media el AR para inhibir la proliferación de la línea de CMTN MDA-MB-231, confirmando resultados preliminares de otros grupos que apuntan a esta vía como una diana importante para complementar las terapias disponibles actualmente en este tipo tumoral. Por otro lado, y como un mecanismo común para ambos tipos de tumores, demostramos que la inhibición de la expresión de TIMP1 impactó negativamente en la capacidad proliferativa de las líneas tumorales MDA-MB-231 y SKOV3. Además, el bloqueo de TIMP1 en un modelo murino ortotópico implicó la inhibición completa de formación de metástasis pulmonares, validando su relevancia para el proceso de diseminación de los tumores TN. Todos estos datos refuerzan el interés del estudio de la población tumoral circulante en ambos tipos de tumores para desarrollar una terapia más personalizada a través del uso de biopsia líquida y terapias dirigidas.

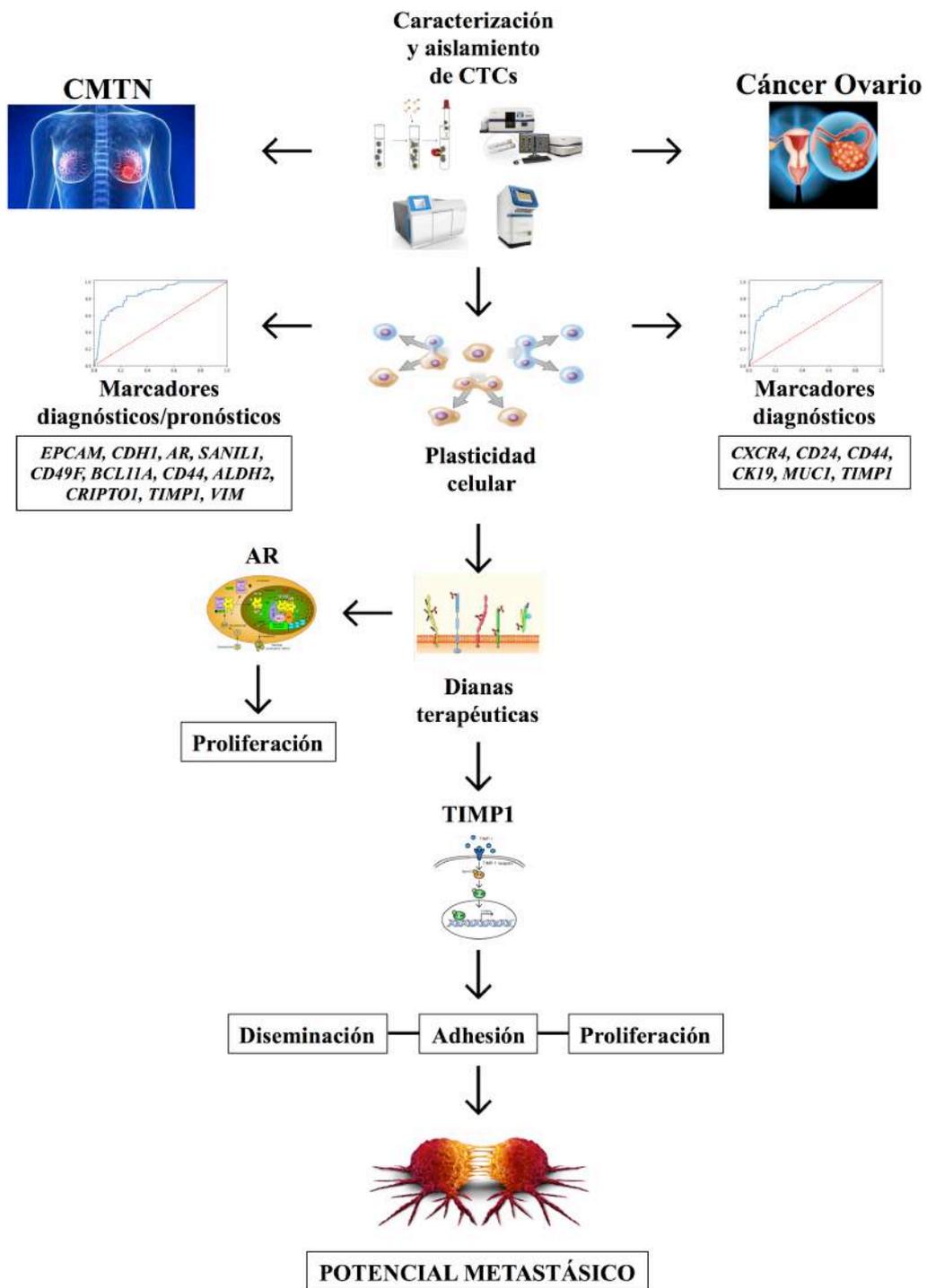


Figura 51: Figura resumen de la aproximación experimental y los principales resultados obtenidos en el presente trabajo.

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, serif font, with the text 'UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO' and 'DE COMPOSICAO' in a smaller font below it.

# **CONCLUSIONES**



## 6-CONCLUSIONES

1. El 41% de las pacientes con cáncer de mama triple negativo y el 21% de las pacientes con cáncer de ovario incluidas en el presente estudio presentaron al menos 1CTC/7,5ml de sangre. Aquellas con niveles superiores a 5CTCs/7,5ml de sangre o presencia de *clusters* presentaron peores tiempos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global, validando su interés como marcador pronóstico.
2. Mediante la combinación de una estrategia de inmunoaislamiento y caracterización transcriptómica hemos conseguido aumentar el porcentaje de detección de CTCs en la cohorte de pacientes con cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario hasta un 60% y 63%, respectivamente. Este análisis nos ha permitido además identificar un panel de marcadores presentes en la población de CTCs con valor diagnóstico y pronóstico.
3. La caracterización transcriptómica de la población de CTCs en pacientes con cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario ha evidenciado una alta plasticidad celular, caracterizada expresión conjunta de marcadores epiteliales, mesenquimales y de célula madre. Esta plasticidad celular se asoció con una mayor agresividad de estos tumores.
4. El aislamiento y la posterior caracterización de las CTCs de pacientes con cáncer de mama triple negativo y con cáncer de ovario permitió incrementar el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la agresividad de este tipo de tumores, aportando información sobre potenciales dianas terapéuticas.
5. El bloqueo farmacológico de la vía androgénica redujo la proliferación de la línea celular MDA-MB231 tanto *in vitro* como *in vivo*, constituyendo una interesante diana terapéutica para tratar a pacientes con cáncer de mama triple negativo con esta vía activa.

6. El silenciamiento de TIMP1 en las líneas celulares MDA-MB231 y SKOV3 se tradujo en la aparición de un fenotipo más epitelial y menos proliferativo tanto *in vitro* como *in vivo*, constituyendo una potencial diana terapéutica para tratar ambos tipos de tumores.
7. El bloqueo de TIMP1 en la línea celular MDA-MB231 inhibió su capacidad de generar metástasis pulmonares en un modelo ortotópico murino, evidenciando su importante papel en el proceso de diseminación del cáncer de mama triple negativo.
8. La caracterización genética a nivel de célula única de la población de CTCs de pacientes con cáncer de mama triple negativo avanzado evidenció la presencia de una importante heterogeneidad molecular, no abarcable con los estudios tradicionales basados en caracterización de tejido primario, constituyendo una herramienta de gran valor para genotipar el tumor de una forma dinámica y no invasiva.

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7-BIBLIOGRAFÍA

- Aaberg-Jessen, C., Christensen, K., Offenberg, H., Bartels, A., Dreehsen, T., Hansen, S., Kristensen, B. W. (2009). Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *Journal of Neuro-Oncology*, 95(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9910-8>
- Aaltonen, K. E., Novosadová, V., Bendahl, P.-O., Graffman, C., Larsson, A.-M., & Rydén, L. (2017). Molecular characterization of circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer reflects evolutionary changes in gene expression under the pressure of systemic therapy. *Oncotarget*, 8(28), 45544–45565. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17271>
- Abd El-Rehim, D. M., Ball, G., Pinder, S. E., Rakha, E., Paish, C., Robertson, J. F. R., Ellis, I. O. (2005). High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *International Journal of Cancer*, 116(3), 340–50. <https://doi.org/10.1002/ijc.21004>
- Abdulkarim, B. S., Cuartero, J., Hanson, J., Deschênes, J., Lesniak, D., & Sabri, S. (2011). Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(21), 2852–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.4714>
- Abuidris, D. O., Weng, H.-Y., Elhaj, A. M., Eltayeb, E. A., Elsanousi, M., Ibnoof, R. S., & Mohammed, S. I. (2016). Incidence and survival rates of ovarian cancer in low-income women in Sudan. *Molecular and Clinical Oncology*, 5(6), 823–828. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.1068>
- Abulkhair, O., Moghraby, J. S., Badri, M., & Alkushi, A. (2012). Clinicopathologic features and prognosis of triple-negative breast

- cancer in patients 40 years of age and younger in Saudi Arabia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 5(2), 101–106. <https://doi.org/10.5144/1658-3876.2012.101>
- Aceto, N., Bardia, A., Wittner, B. S., Donaldson, M. C., O’Keefe, R., Engstrom, A., Maheswaran, S. (2018). AR Expression in Breast Cancer CTCs Associates with Bone Metastases. *Molecular Cancer Research : MCR*, 16(4), 720–727. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0480>
- Agelaki, S., Dragolia, M., Markonanolaki, H., Alkahtani, S., Stournaras, C., Georgoulas, V., & Kallergi, G. (2017). Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. *Oncotarget*, 8(3), 5309–5322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14144>
- Agelaki, S., Kalykaki, A., Markomanolaki, H., Papadaki, M. A., Kallergi, G., Hatzidaki, D., Georgoulas, V. (2015). Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*, 10(6), e0123683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123683>
- Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M. Z., Andre, F., De Cremoux, P., ... Chouaib, S. (2013). Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-cell-Mediated Lysis. *Cancer Research*, 73(8), 2418–2427. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2432>
- Aktas, B., Kasimir-Bauer, S., Heubner, M., Kimmig, R., & Wimberger, P. (2011). Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 21(5), 822–30. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318216cb91>
- Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., & Kasimir-Bauer, S. (2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer*

- Research : BCR*, 11(4), R46. <https://doi.org/10.1186/bcr2333>
- Alhuqail, A.-J., Alzahrani, A., Almubarak, H., Al-Qadheeb, S., Alghofaili, L., Almoghrabi, N., Karakas, B. (2018). High prevalence of deleterious BRCA1 and BRCA2 germline mutations in arab breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4635-4>
- Alli, E., Sharma, V. B., Sunderesakumar, P., & Ford, J. M. (2009). Defective repair of oxidative dna damage in triple-negative breast cancer confers sensitivity to inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Research*, 69(8), 3589–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4016>
- Alonso-alconada, L., Muinelo-romay, L., Madissoo, K., Diaz-lopez, A., Krakstad, C., Trovik, J., Romano, A. (2014). Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer. *Molecular Cancer*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-223>.
- Anders, C. K., Abramson, V., Tan, T., & Dent, R. (2016). The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology Meeting*, 35, 34–42. [https://doi.org/10.14694/EDBK\\_159135](https://doi.org/10.14694/EDBK_159135)
- Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9 Suppl 2, S73-81. <https://doi.org/10.3816/CBC.2009.s.008>
- Anderson, K. N., Schwab, R. B., & Martinez, M. E. (2014). Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2852-7>
- Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Research and Treatment*, 76(1), 27–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408373>
- Anglesio, M. S., Wiegand, K. C., Melnyk, N., Chow, C., Salamanca,

- C., Prentice, L. M., ... Huntsman, D. G. (2013). Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PloS One*, 8(9), e72162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072162>
- Antonarakis, E. S. (2013). Enzalutamide: The emperor of all anti-androgens. *Translational Andrology and Urology*, 2(2), 119–120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076589>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Luber, B., Wang, H., Chen, Y., Zhu, Y., ... Luo, J. (2017). Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(19), 2149–2156. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.1961>
- Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R., Lele, S., ... Burger, R. A. (2006). Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 34–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052985>
- Astvatsaturyan, K., Yue, Y., Walts, A. E., & Bose, S. (2018). Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. *PloS One*, 13(6), e0197827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197827>
- Babayan, A., Hannemann, J., Spötter, J., Müller, V., Pantel, K., & Joosse, S. A. (2013). Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PloS One*, 8(9), e75038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075038>
- Balacescu, O., Balacescu, L., Virtic, O., Visan, S., Gherman, C., Drigla, F., ... Berindan-Neagoe, I. (2016). Blood Genome-Wide Transcriptional Profiles of HER2 Negative Breast Cancers Patients. *Mediators of Inflammation*, 2016, 3239167. <https://doi.org/10.1155/2016/3239167>
- Bane, A., Dushanthi, A. V., & Andrulis, I. L. (2013). Clinical – pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers, 195–205. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2591-1>

- Bao, H., Burke, P. A., Huang, J., Chen, X., Brohawn, P. Z., Yao, Y., Lavalley, T. M. (2013). Circulating tumor cells: application as a biomarker for molecular characterization and predictor of survival in an all-comer solid tumor phase I clinical study. *PloS One*, 8(8), e58557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058557>
- Barbazán, J., Alonso-Alconada, L., Muínelo-Romay, L., Vieito, M., Abalo, A., Alonso-Nocelo, M., Abal, M. (2012). Molecular characterization of circulating tumor cells in human metastatic colorectal cancer. *PloS One*, 7(7), e40476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040476>
- Barriere, G., Fici, P., Gallerani, G., Fabbri, F., Zoli, W., & Rigaud, M. (2014). Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Annals of Translational Medicine*, 2(11), 109. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04>
- Beaufort, C. M., Helmijr, J. C. A., Piskorz, A. M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., Helleman, J. (2014). Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PloS One*, 9(9), e103988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988>
- Będkowska, G. E., Gacuta, E., Zajkowska, M., Głazewska, E. K., Osada, J., Szmitkowski, M., Ławicki, S. (2017). Plasma levels of MMP-7 and TIMP-1 in laboratory diagnostics and differentiation of selected histological types of epithelial ovarian cancers. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0338-z>
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5), 499–507. <https://doi.org/10.1038/ng.127>
- Beuvink, I., Boulay, A., Fumagalli, S., Zilbermann, F., Ruetz, S., O'Reilly, T., Thomas, G. (2005). The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell*, 120(6), 747–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.040>

- Bidard, F.-C., Conforti, R., Boulet, T., Michiels, S., Delaloge, S., & André, F. (2007). Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 “triple-negative” breast cancers. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *18*(7), 1285–6. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm360>
- Bland, M., & E., C. (2007). La mama : manejo multidisciplinario de la enfermedades benignas y malignas. Editorial Panamericana.
- Blassl, C., Kuhlmann, J. D., Webers, A., Wimberger, P., Fehm, T., & Neubauer, H. (2016). Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer - Establishment of a multi-marker gene panel. *Molecular Oncology*, *10*(7), 1030–42. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.002>
- Bonnomet, A., Brysse, A., Tachsidis, A., Waltham, M., Thompson, E. W., Polette, M., & Gilles, C. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *15*(2), 261–73. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
- Bookman, M. A. (2005). Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *International Journal of Gynecological Cancer*, *15*(s3), 212–220. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00444.x>
- Boral, D., Vishnoi, M., Liu, H. N., Yin, W., Sprouse, M. L., Scamardo, A., ... Marchetti, D. (2017). Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nature Communications*, *8*(1), 196. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00196-1>
- Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., & Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(29), 7350–60. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.3845>
- Brun, J. L., Cortez, A., Lesieur, B., Uzan, S., Rouzier, R., & Daraï, E. (2012). Expression of MMP-2, -7, -9, MT1-MMP and TIMP-1

- and -2 has no prognostic relevance in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Oncology Reports*, 27(4), 1049–1057. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1608>
- Buamah, P. (2000). Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *Journal of Surgical Oncology*, 75(4), 264–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135268>
- Bulfoni, M., Gerratana, L., Del Ben, F., Marzinotto, S., Sorrentino, M., Turetta, M., Cesselli, D. (2016). In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis. *Breast Cancer Research: BCR*, 18(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0687-3>
- Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/730202>
- Cancer Genome Atlas Network, Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Caprotti, R., Bonardi, C., Crippa, S., Mussi, C., Angelini, C., & Uggeri, F. (2006). Palliative surgery for recurrent bowel obstruction due to advanced ovarian cancer. *Minerva Ginecologica*, 58(3), 239–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16783296>
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492–502. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(6), 417–27. <https://doi.org/10.1038/nrd3455>

- Castro-Giner, F., Scheidmann, M. C., & Aceto, N. (2018). Beyond Enumeration: Functional and Computational Analysis of Circulating Tumor Cells to Investigate Cancer Metastasis. *Frontiers in Medicine*, 5, 34. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00034>
- Castro, N. P., Fedorova-Abrams, N. D., Merchant, A. S., Rangel, M. C., Nagaoka, T., Karasawa, H., ... Salomon, D. S. (2015). Cripto-1 as a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 6(14), 11910–29. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4182>
- Chang, H. Y., Nuyten, D. S. A., Sneddon, J. B., Hastie, T., Tibshirani, R., Sørlie, T., van de Vijver, M. J. (2005). Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3738–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409462102>
- Chang, M.-C., Chen, C.-A., Chen, P.-J., Chiang, Y.-C., Chen, Y.-L., Mao, T.-L., Cheng, W.-F. (2012). Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *The Biochemical Journal*, 442(2), 293–302. <https://doi.org/10.1042/BJ20110282>
- Chaveepojnkamjorn, W., Thotong, R., Sativipawee, P., & Pitikultang, S. (2017). Body Mass Index and Breast Cancer Risk among Thai Premenopausal Women: a Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 18(11), 3097–3101. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.11.3097>
- Chebouti, I., Kasimir-Bauer, S., Buderath, P., Wimberger, P., Hauch, S., Kimmig, R., & Kuhlmann, J. D. (2017). EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy. *Oncotarget*, 8(30), 48820–48831. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16179>
- Chen, D., Wang, J., Zhang, Y., Chen, J., Yang, C., Cao, W., ... Dou, J. (2013). Effect of down-regulated transcriptional repressor ZEB1 on the epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*,

- 23(8), 1357–66. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182a5e760>
- Chen, X., Yuan, Y., Garfield, D. H., Wu, J., Huang, O., & Shen, K. (2014). Both carboplatin and bevacizumab improve pathological complete remission rate in neoadjuvant treatment of triple negative breast cancer: a meta-analysis. *PloS One*, *9*(9), e108405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108405>
- Chen, Y.-H., Hancock, B. A., Solzak, J. P., Brinza, D., Scafe, C., Miller, K. D., & Radovich, M. (2017). Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer*, *3*, 24. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0028-4>
- Cheng, G., Fan, X., Hao, M., Wang, J., Zhou, X., & Sun, X. (2016). Higher levels of TIMP-1 expression are associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*, *15*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0515-5>
- Cheng, X., Zhang, L., Chen, Y., & Qing, C. (2017). Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the “liquid biopsies” in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, *10*(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0369-5>
- Cheung, K. J., & Ewald, A. J. (2014). Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, *30*, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.07.003>
- Christine L. Chaffer, R. A. W. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6024), 1559–1564.
- Chromek, M., Tullus, K., Lundahl, J., & Brauner, A. (2004). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Activates Normal Human Granulocytes, Protects Them from Apoptosis, and Blocks Their Transmigration during Inflammation. *Infection and Immunity*, *72*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.82-88.2004>
- Clark, D. W., & Palle, K. (2016). Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets. *Annals of Translational Medicine*, *4*(24), 518. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.82>
- Clarke, C. H., Yip, C., Badgwell, D., Fung, E. T., Coombes, K. R.,

- Zhang, Z., ... Bast, R. C. (2011). Proteomic biomarkers apolipoprotein A1, truncated transthyretin and connective tissue activating protein III enhance the sensitivity of CA125 for detecting early stage epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 122(3), 548–53. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.06.002>
- Coburn, S. B., Bray, F., Sherman, M. E., & Trabert, B. (2017). International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *International Journal of Cancer*, 140(11), 2451–2460. <https://doi.org/10.1002/ijc.30676>
- Cochrane, D. R., Bernales, S., Jacobsen, B. M., Cittelly, D. M., Howe, E. N., D'Amato, N. C., ... Richer, J. K. (2014). Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(1), R7. <https://doi.org/10.1186/bcr3599>
- Colan, Ho-Yen, et al. (2012). Characterization of basal-like breast cancer: an update. *Elsevier*.
- Colditz, G. A., Rosner, B. A., Chen, W. Y., Holmes, M. D., & Hankinson, S. E. (2004). Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(3), 218–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759989>
- Collett, K., Stefansson, I. M., Eide, J., Braaten, A., Wang, H., Eide, G. E., ... Akslen, L. A. (2005). A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(5), 1108–12. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0394>
- Collina, F., Di Bonito, M., Li Bergolis, V., De Laurentiis, M., Vitagliano, C., Cerrone, M., ... Botti, G. (2015). Prognostic Value of Cancer Stem Cells Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2015, 158682. <https://doi.org/10.1155/2015/158682>
- Collins, L. C., Cole, K. S., Marotti, J. D., Hu, R., Schnitt, S. J., & Tamimi, R. M. (2011). Androgen receptor expression in breast

- cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, 24(7), 924–31. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.54>
- Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A., & Lisowska, K. M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81(1), 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>
- Coumans, F. A. W., Ligthart, S. T., Uhr, J. W., & Terstappen, L. W. M. M. (2012). Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5711–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1585>
- Crane, T. E., Khulpateea, B. R., Alberts, D. S., Basen-Engquist, K., & Thomson, C. A. (2014). Dietary intake and ovarian cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(2), 255–73. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0515>
- Cua, S., Tan, H. L., Fong, W. J., Chin, A., Lau, A., Ding, V., ... Choo, A. (2018). Targeting of embryonic annexin A2 expressed on ovarian and breast cancer by the novel monoclonal antibody 2448. *Oncotarget*, 9(17), 13206–13221. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24152>
- Culig, Z., & Santer, F. R. (2014). Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 33(2–3), 413–27. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9474-0>
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., ... Bastian, B. C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 353(20), 2135–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050092>
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10983>

- D'Angelo, R. C., Liu, X.-W., Najy, A. J., Jung, Y. S., Won, J., Chai, K. X., ... Kim, H.-R. C. (2014). TIMP-1 via TWIST1 Induces EMT Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. *Molecular Cancer Research*, 12(9), 1324–1333. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0105>
- D'Angelo, R. C., Liu, X.-W., Najy, A. J., Jung, Y. S., Won, J., Chai, K. X., ... Kim, H.-R. C. H.-R. C. (2014). TIMP-1 via TWIST1 Induces EMT Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. *Molecular Cancer Research: MCR*, 12(9), 1324–1333. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0105>
- D'Costa, Z., Jones, K., Azad, A., van Stiphout, R., Lim, S. Y., Gomes, A. L., ... Fokas, E. (2017). Gemcitabine-Induced TIMP1 Attenuates Therapy Response and Promotes Tumor Growth and Liver Metastasis in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 77(21), 5952–5962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2833>
- Dai, X., Chen, A., & Bai, Z. (2014). Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. *Scientific Reports*, 4, 6566. <https://doi.org/10.1038/srep06566>
- Davidson, B., Holth, A., Hellesylt, E., Tan, T. Z., Huang, R. Y.-J., Tropé, C., ... Thiery, J. P. (2015). The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Human Pathology*, 46(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.10.004>
- de Kruijff, I. E., Sieuwerts, A. M., Onstenk, W., Jager, A., Hamberg, P., de Jongh, F. E., Sleijfer, S. (2019). Androgen receptor expression in circulating tumor cells of patients with metastatic breast cancer. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32209>
- De Luca, F., Rotunno, G., Salvianti, F., Galardi, F., Pestrin, M., Gabellini, S., ... Pinzani, P. (2016). Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 7(18), 26107–19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8431>
- de Wit, S., van Dalum, G., Lenferink, A. T. M., Tibbe, A. G. J., Hiltermann, T. J. N., Groen, H. J. M., Terstappen, L. W. M. M.

- (2015). The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells. *Scientific Reports*, 5, 12270. <https://doi.org/10.1038/srep12270>
- Dehm, S. M., Montgomery, B., & Plymate, S. R. (2019). AR-Variant-Positive CTC: A Surrogate for a Surrogate for Taxane Therapy Outcome? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(6), 1696–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3727>
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Brase, J. C., Sinn, B. V, Gade, S., Kronenwett, R., Loibl, S. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(9), 983–91. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.1967>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4429–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Docherty, A. J., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J., Reynolds, J. J. (1985). Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, 318(6041), 66–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3903517>
- Dong, Y., Kaushal, A., Bui, L., Chu, S., Fuller, P. J., Nicklin, J., ... Clements, J. A. (2001). Human kallikrein 4 (KLK4) is highly expressed in serous ovarian carcinomas. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(8), 2363–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489814>
- du Bois, A., Quinn, M., Thigpen, T., Vermorken, J., Avall-Lundqvist, E., Bookman, M., Organizational team of the two prior International OCCC. (2005). 2004 consensus statements on the

- management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIg OCCc 2004). *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 16 Suppl 8, viii7-viii12. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi961>
- Duncan, T. J., Al-Attar, A., Rolland, P., Scott, I. V., Deen, S., Liu, D. T. Y., ... Durrant, L. G. (2008). Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(10), 3030–5. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1888>
- Earl, H. M., Hiller, L., Dunn, J. A., Blenkinsop, C., Grybowicz, L., Vallier, A.-L., ... ARTEMIS Investigators. (2015). Efficacy of neoadjuvant bevacizumab added to docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, for women with HER2-negative early breast cancer (ARTEMIS): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 16(6), 656–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70137-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70137-3)
- Egea, V., Zahler, S., Rieth, N., Neth, P., Popp, T., Kehe, K., ... Ries, C. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), E309-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115083109>
- Eisenkop, S. M., Friedman, R. L., & Spirtos, N. M. (2000). The role of secondary cytoreductive surgery in the treatment of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*, 88(1), 144–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618617>
- Elsawaf, Z., Sinn, H.-P., Rom, J., Bermejo, J. L., Schneeweiss, A., & Aulmann, S. (2013). Biological subtypes of triple-negative breast cancer are associated with distinct morphological changes and clinical behaviour. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22(5), 986–92. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.05.012>
- Eralp, Y., Derin, D., Ozluk, Y., Yavuz, E., Guney, N., Saip, P., ...

- Topuz, E. (2008). MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *19*(4), 669–74. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm522>
- Fabregat, I., Malfettone, A., & Soukupova, J. (2016). New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(3). <https://doi.org/10.3390/jcm5030037>
- Fan, C., Oh, D. S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D. S. A., Nobel, A. B., Perou, C. M. (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, *355*(6), 560–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052933>
- Fata, J. E., Leco, K. J., Moorehead, R. A., Martin, D. C., & Khokha, R. (1999). Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Developmental Biology*, *211*(2), 238–54. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9313>
- Fehm, T., Hoffmann, O., Aktas, B., Becker, S., Solomayer, E. F., Wallwiener, D., Kasimir-bauer, S. (2009). Research article Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells, *11*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1186/bcr2349>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fernandez, S. V., Bingham, C., Fittipaldi, P., Austin, L., Palazzo, J., Palmer, G., Cristofanilli, M. (2014). TP53 mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Research : BCR*, *16*(5), 445. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0445-3>
- Ferraro, D. A., Gaborit, N., Maron, R., Cohen-Dvashi, H., Porat, Z.,

- Pareja, F., Yarden, Y. (2013). Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(5), 1815–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220763110>
- Figueras, A., Alsina-Sanchís, E., Lahiguera, A., Abreu, M., Muínelo-Romay, L., Moreno-Bueno, G., ... Viñals, F. (2017). a Role for Cxcr4 in Peritoneal and Hematogenous Ovarian Cancer Dissemination. *Molecular Cancer Therapeutics*, molcanther.0643.2017. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0643>
- Forte, D., Salvestrini, V., Corradi, G., Rossi, L., Catani, L., Lemoli, R. M., Curti, A. (2017). The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promotes survival and migration of acute myeloid leukemia cells through CD63/PI3K/Akt/p21 signaling. *Oncotarget*, *8*(2), 2261–2274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13664>
- Freedman, G. M., Anderson, P. R., Li, T., & Nicolaou, N. (2009). Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. *Cancer*, *115*(5), 946–951. <https://doi.org/10.1002/cncr.24094>
- Gabriel, M. T., Calleja, L. R., Chalopin, A., Ory, B., & Heymann, D. (2016). Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clinical Chemistry*, *62*(4), 571–81. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249706>
- Gadiyaram, V., Kurian, S., Abraham, J., Hobbs, G., Vona-Davis, L., & Vona-Davis, L. (2009). Predominance of Brain and Lung Metastases in Triple-Negative Breast Cancer Patients.: *Cancer Research*, *69*(24 Supplement), 6159–6159. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-09-6159>
- Gajjar, K., Ogden, G., Mujahid, M. I., & Razvi, K. (2012). Symptoms and risk factors of ovarian cancer: a survey in primary care. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, *2012*, 754197. <https://doi.org/10.5402/2012/754197>
- Galceran, J., Ameijide, A., Carulla, M., Mateos, A., Quirós, J. R.,

- Rojas, D., REDECAN Working Group. (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 19(7), 799–825. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1607-9>
- Garay, J. P., Karakas, B., Abukhdeir, A. M., Cosgrove, D. P., Gustin, J. P., Higgins, M. J., Park, B. H. (2012). The growth response to androgen receptor signaling in ER $\alpha$ -negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Research: BCR*, 14(1), R27. <https://doi.org/10.1186/bcr3112>
- Georgoulas, V., Bozionelou, V., Agelaki, S., Perraki, M., Apostolaki, S., Kallergi, G., Mavroudis, D. (2012). Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(7), 1744–50. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds020>
- Gianni, L., Mansutti, M., Anton, A., Calvo, L., Bisagni, G., Bermejo, B., Tusquets, I. (2018). Comparing Neoadjuvant Nab-paclitaxel vs Paclitaxel Both Followed by Anthracycline Regimens in Women With ERBB2/HER2 -Negative Breast Cancer—the Evaluating Treatment With Neoadjuvant Abraxane (ETNA) Trial. *JAMA Oncology*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4612>
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., ... Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555–67. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Giovannelli, P., Di Donato, M., Galasso, G., Di Zazzo, E., Bilancio, A., & Migliaccio, A. (2018). The Androgen Receptor in Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 492. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00492>
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., &

- Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 20(12), 1913–27. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>
- Gomez-Miragaya, J., & González-Suárez, E. (2017). Tumor-initiating CD49f cells are a hallmark of chemoresistant triple negative breast cancer. *Molecular & Cellular Oncology*, 4(4), e1338208. <https://doi.org/10.1080/23723556.2017.1338208>
- Gong, Y., Scott, E., Lu, R., Xu, Y., Oh, W. K., & Yu, Q. (2013). TIMP-1 promotes accumulation of cancer associated fibroblasts and cancer progression. *PloS One*, 8(10), e77366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077366>
- Gorges, T. M., Kuske, A., Röck, K., Mauermann, O., Müller, V., Peine, S., Pantel, K. (2016). Accession of Tumor Heterogeneity by Multiplex Transcriptome Profiling of Single Circulating Tumor Cells. *Clinical Chemistry*, 62(11), 1504–1515. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.260299>
- Gouyer, V., Conti, M., Devos, P., Zerimech, F., Copin, M. C., Crème, E., ... Huet, G. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer*, 103(8), 1676–1684. <https://doi.org/10.1002/cncr.20965>
- Greenberg, S., & Rugo, H. S. (2010). Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 16(1), 33–8. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181d38514>
- Greene, J., Wang, M., Yiliang, E., Raymond, L. A., Rosen, C., Shi, Y. E., & Liu, Y. E. (1996). Cell Biology and Metabolism: Molecular Cloning and Characterization of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4 \*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 271(48), 30375–30380.
- Grover, P. K., Cummins, A. G., Price, T. J., Roberts-Thomson, I. C., & Hardingham, J. E. (2014). Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Annals of Oncology : Official Journal of the European*

- Society for Medical Oncology*, 25(8), 1506–16.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu018>
- Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A., & Stetler-Stevenson, M. (1998). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(11), 2002–10. <https://doi.org/10.1172/JCI2881>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- Haber, D. A., & Velculescu, V. E. (2014). Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discovery*, 4(6), 650–61. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1014>
- Han, C., Bellone, S., Siegel, E. R., Altwerger, G., Menderes, G., Bonazzoli, E., ... Santin, A. D. (2018). A novel multiple biomarker panel for the early detection of high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.03.050>
- Haslehurst, A. M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., ... Feilotter, H. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 12, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-91>
- Hastak, K., Alli, E., & Ford, J. M. (2010). Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin. *Cancer Research*, 70(20), 7970–80.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4521>
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of Cell Biology*, 148(4), 779–90.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.779>
- Hegazy, M. A. F., Hegazi, R. A. F., Elshafei, M. A., Setit, A. E., Elshamy, M. R., Eltatoongy, M., & Halim, A. A. F. (2005). Neoadjuvant chemotherapy versus primary surgery in advanced

- ovarian carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 3, 57.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7819-3-57>
- Heitzer, E., Auer, M., Gasch, C., Pichler, M., Ulz, P., Hoffmann, E. M., ... Speicher, M. R. (2013). Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Research*, 73(10), 2965–75.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4140>
- Hellman, N. E., Spector, J., Robinson, J., Zuo, X., Saunier, S., Antignac, C., Lipschutz, J. H. (2008). Matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1), regulated by the MAPK pathway, are both necessary for Madin-Darby canine kidney tubulogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4272–82.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M708027200>
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(2 Suppl), 21–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>
- Heymann, D., & Téllez-Gabriel, M. (n.d.). Circulating Tumor Cells: The Importance of Single Cell Analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1068, 45–58.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-0502-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0502-3_5)
- Hodgkinson, C. L., Morrow, C. J., Li, Y., Metcalf, R. L., Rothwell, D. G., Trapani, F., Dive, C. (2014). Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, 20(8), 897–903.  
<https://doi.org/10.1038/nm.3600>
- Honorio, M., & Guerra Pereira, N. (2016). Decreased Survival in African Patients with Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Palliative Care & Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.4172/2165-7386.1000270>
- Hou, J.-M., Krebs, M., Ward, T., Sloane, R., Priest, L., Hughes, A., ... Dive, C. (2011). Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 989–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.003>

- Howlader N, Krapcho M, Miller D, et al. (2015). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. *National Cancer Institute*.
- Hu, X., Stern, H. M., Ge, L., O'Brien, C., Haydu, L., Honchell, C. D., Cavet, G. (2009). Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(4), 511–22. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0107>
- Huo, D., Ikpatt, F., Khramtsov, A., Dangou, J.-M., Nanda, R., Dignam, J., ... Olopade, O. I. (2009). Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals overrepresentation of triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(27), 4515–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6873>
- Hurley, J., Reis, I. M., Rodgers, S. E., Gomez-Fernandez, C., Wright, J., Leone, J. P., Pegram, M. D. (2013). The use of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in locally advanced breast cancer that is triple negative: retrospective analysis of 144 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(3), 783–94. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2497-y>
- Idowu, M. O., Kmiecik, M., Dumur, C., Burton, R. S., Grimes, M. M., Powers, C. N., & Manjili, M. H. (2012). CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Human Pathology*, 43(3), 364–73. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.05.005>
- Ismail-Khan, R., & Bui, M. M. (2010). A review of triple-negative breast cancer. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 17(3), 173–6. <https://doi.org/10.1177/107327481001700305>
- Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., & Honjo, T. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0329-9>
- Iwata, H., Masuda, N., Yamamoto, D., Sagara, Y., Sato, N., Yamamoto, Y., ... Kuroi, K. (2017). Circulating tumor cells as a

- prognostic marker for efficacy in the randomized phase III JO21095 trial in Japanese patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *162*(3), 501–510. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4138-3>
- Jansson, S., Bendahl, P.-O., Larsson, A.-M., Aaltonen, K. E., & Rydén, L. (2016). Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer*, *16*, 433. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2406-y>
- Joensuu, H., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Huovinen, R., Jukkola-Vuorinen, A., Tanner, M., Kokko, R., ... Lindman, H. (2010). Abstract S4-1: FinXX Final 5-Year Analysis: Results of the Randomised, Open-Label, Phase III Trial in Medium-to-High Risk Early Breast Cancer. *Cancer Research*, *70*(24 Supplement), S4-1-S4-1. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS10-S4-1>
- Joosse, S. A., Gorges, T. M., & Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303698>
- Joosse, S. A., & Pantel, K. (2013). Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Research*, *73*(1), 8–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3422>
- Juerß, D., Zwar, M., Giesen, U., Nolte, R., Kriesen, S., Baiocco, G., ... Hildebrandt, G. (2017). Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells. *Radiation Oncology (London, England)*, *12*(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13014-017-0895-8>
- Kajiyama, H., Hosono, S., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Yamamoto, E., Kikkawa, F. (2006). Twist expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology*, *71*(5–6), 394–401. <https://doi.org/10.1159/000107108>
- Kallergi, G., Papadaki, M. A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Agelaki, S. (2011). Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour

- cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(3), R59. <https://doi.org/10.1186/bcr2896>
- Kasimir-Bauer, S., Bittner, A.-K., König, L., Reiter, K., Keller, T., Kimmig, R., & Hoffmann, O. (2016). Does primary neoadjuvant systemic therapy eradicate minimal residual disease? Analysis of disseminated and circulating tumor cells before and after therapy. *Breast Cancer Research : BCR*, 18(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0679-3>
- Kasimir-Bauer, S., Hoffmann, O., Wallwiener, D., Kimmig, R., & Fehm, T. (2012). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Research : BCR*, 14(1), R15. <https://doi.org/10.1186/bcr3099>
- Khaled, W. T., Choon Lee, S., Stingl, J., Chen, X., Raza Ali, H., Rueda, O. M., Liu, P. (2015). BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. *Nature Communications*, 6(1), 5987. <https://doi.org/10.1038/ncomms6987>
- Kim, H. S., Lee, Y., Lim, Y. A., Kang, H. J., & Kim, L. S. (2011).  $\alpha$ B-Crystallin is a Novel Oncoprotein Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 14(1), 14. <https://doi.org/10.4048/jbc.2011.14.1.14>
- Kim, J.-H., Skates, S. J., Uede, T., Wong, K., Schorge, J. O., Feltmate, C. M., Mok, S. C. (2002). Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*, 287(13), 1671–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11926891>
- King, T. D., Suto, M. J., & Li, Y. (2012). The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 13–8. <https://doi.org/10.1002/jcb.23350>
- Kluger, H. M., Hoyt, K., Bacchiocchi, A., Mayer, T., Kirsch, J., Kluger, Y., Halaban, R. (2011). Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer*

- Research*, 17(8), 2417–25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2402>
- Kojima, Y., Kawamoto, H., Nishikawa, T., Hayami, R., Shimo, A., Haku, E., Tsugawa, K. (2018). Feasibility Study of Weekly Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (150 mg/m<sup>2</sup>) Followed by Fluorouracil, Epirubicin, and Cyclophosphamide Therapy as Neoadjuvant Chemotherapy for HER2-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.01.002>
- Kölbl, A., Jeschke, U., & Andergassen, U. (2016). The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms17081308>
- Kolostova, K., Pinkas, M., Jakabova, A., Pospisilova, E., Svobodova, P., Spicka, J., Bobek, V. (2016). Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer. *American Journal of Cancer Research*, 6(5), 973–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27293992>
- Krebsbach, P. H., & Villa-Diaz, L. G. (2017). The Role of Integrin  $\alpha 6$  (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells and Development*, 26(15), 1090–1099. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0319>
- Kuhlmann, J. D., Wimberger, P., Bankfalvi, A., Keller, T., Schöler, S., Aktas, B., Kasimir-Bauer, S. (2014). ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. *Clinical Chemistry*, 60(10), 1282–9. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224808>
- Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(2), 247–69. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>
- Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American Journal of Pathology*, 186(4), 733–47. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>
- Kuroda, N., Masuya, M., Tawara, I., Tsuboi, J., Yoneda, M.,

- Nishikawa, K., Katayama, N. (2019). Infiltrating CCR2+ monocytes and their progenies, fibrocytes, contribute to colon fibrosis by inhibiting collagen degradation through the production of TIMP-1. *Scientific Reports*, 9(1), 8568. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45012-6>
- Lange, C. A., Gioeli, D., Hammes, S. R., & Marker, P. C. (2007). Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer. *Annual Review of Physiology*, 69, 171–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160319>
- Lee, Y., Kwon, S., Ko, B., Seo, J., Lee, J., Kim, H., ... Son, B. (2009). Triple Negative Breast Cancer Has a Worse Prognosis within 3 Years after Treatment Compared to Non-Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 69(24 Supplement), 4044–4044. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-09-4044>
- Leffers, N., Lambeck, A. J. A., Gooden, M. J. M., Hoogeboom, B.-N., Wolf, R., Hamming, I. E., Nijman, H. W. (2009). Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *International Journal of Cancer*, 125(9), 2104–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.24597>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–67. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Leidy, J., Khan, A., Kandil, D. (2014). Basal-Like Breast Cancer, Clinicopathologic, U., & Features, M. 138. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0439-RA>
- León-Mateos, L., Casas, H., Abalo, A., Vieito, M., Abreu, M., Anido, U., ... Muínelo-Romay, L. (2017). Improving circulating tumor cells enumeration and characterization to predict outcome in first line chemotherapy mCRPC patients. *Oncotarget*, 1–14. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18025>
- Li, G., Fridman, R., & Kim, H. R. (1999). Tissue inhibitor of

- metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Research*, 59(24), 6267–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626822>
- Li, N., Yang, L., Deng, X., & Sun, Y. (2018). Effects of isoliquiritigenin on ovarian cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, 11, 1633–1642. <https://doi.org/10.2147/OTT.S149295>
- Liao, R. S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., & Raj, G. V. (2013). Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Translational Andrology and Urology*, 2(3), 187–96. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07>
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–81. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Lindner, R., Sullivan, C., Offor, O., Lezon-Geyda, K., Halligan, K., Fischbach, N., Harris, L. N. (2013). Molecular phenotypes in triple negative breast cancer from African American patients suggest targets for therapy. *PloS One*, 8(11), e71915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071915>
- Liu, G., Yang, D., Sun, Y., Shmulevich, I., Xue, F., Sood, A. K., & Zhang, W. (2012). Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer. *Pharmacogenomics*, 13(13), 1523–35. <https://doi.org/10.2217/pgs.12.137>
- Liu, J. F., Kindelberger, D., Doyle, C., Lowe, A., Barry, W. T., & Matulonis, U. A. (2013). Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology*, 131(2), 352–6. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.006>
- Liu, K., Newbury, P. A., Glicksberg, B. S., Zeng, W. Z. D., Paithankar, S., Andrechek, E. R., & Chen, B. (2019). Evaluating cell lines as models for metastatic breast cancer through integrative analysis of genomic data. *Nature Communications*, 10(1), 2138. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10148-6>

- Liu, M., Liu, Y., Deng, L., Wang, D., He, X., Zhou, L., ... Liu, S. (2018). Transcriptional profiles of different states of cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*, *17*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0809-x>
- Liu, S., Liu, C., Min, X., Ji, Y., Wang, N., Liu, D., ... Li, K. (2013). Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a meta-analysis. *PloS One*, *8*(11), e81050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081050>
- Lou, E., Vogel, R. I., Teoh, D., Hoostal, S., Grad, A., Gerber, M., ... Geller, M. A. (2018). Assessment of Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker of Histology in Women With Suspected Ovarian Cancer. *Laboratory Medicine*, *49*(2), 134–139. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx084>
- Lu, Y.-J., Wang, P., Wang, X., Peng, J., Zhu, Y.-W., & Shen, N. (2016). The significant prognostic value of circulating tumor cells in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, *7*(24), 37361–37369. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8156>
- Lund, M. J., Trivers, K. F., Porter, P. L., Coates, R. J., Leyland-Jones, B., Brawley, O. W., Eley, J. W. (2009). Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Research and Treatment*, *113*(2), 357–70. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9926-3>
- Määttä, M., Talvensaaari-Mattila, A., Turpeenniemi-Hujanen, T., & Santala, M. (2007). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in differential diagnosis between low malignant potential (LMP) and malignant ovarian tumours. *Anticancer Research*, *27*(4C), 2753–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17695443>
- Madic, J., Kiialainen, A., Bidard, F., Birzele, F., Ramey, G., Leroy, Q., ... Lebofsky, R. (2014). Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients, 1–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.29265>
- Magbanua, M. J. M., Carey, L. A., DeLuca, A., Hwang, J., Scott, J. H., Rimawi, M. F., ... Translational Breast Cancer Research

- Consortium. (2015). Circulating tumor cell analysis in metastatic triple-negative breast cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(5), 1098–105. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1948>
- Mahner, S., Woelber, L., Eulenburg, C., Schwarz, J., Carney, W., Jaenicke, F., Mueller, V. (2010). TIMP-1 and VEGF-165 serum concentration during first-line therapy of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*, 10, 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-139>
- Mallini, P., Lennard, T., Kirby, J., & Meeson, A. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 40(3), 341–8. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.008>
- Manenti, L., Paganoni, P., Floriani, I., Landoni, F., Torri, V., Buda, A., Giavazzi, R. (2003). Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 39(13), 1948–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932675>
- Mangili, G., Aletti, G., Frigerio, L., Franchi, M., Panacci, N., Viganò, R., Ferrari, A. (2005). Palliative care for intestinal obstruction in recurrent ovarian cancer: a multivariate analysis. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 15(5), 830–5. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00144.x>
- Manton K.G., Akushevich, J. K. (2009). *Cancer Mortality and Morbidity Patterns in the U.S. Population*. Springer. New York, NY.
- Mao, K., Yang, Y., Wu, W., Liang, S., Deng, H., & Liu, J. (2017). Risk of second breast cancers after lobular carcinoma in situ according to hormone receptor status. *PLoS ONE*, 12(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176417>
- Mao, M., Zheng, X., Jin, B., Zhang, F., Zhu, L., & Cui, L. (2017). Effects of CD44 and E-cadherin overexpression on the proliferation, adhesion and invasion of ovarian cancer cells.

- Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6), 5557–5563.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.5259>
- Mariscal, J., Alonso-Nocelo, M., Muínelo-Romay, L., Barbazan, J., Vieito, M., Abalo, A., Abal, M. (2016). Molecular Profiling of Circulating Tumour Cells Identifies Notch1 as a Principal Regulator in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*, 6, 37820. <https://doi.org/10.1038/srep37820>
- Markiewicz, A., Topa, J., Nagel, A., Skokowski, J., Seroczynska, B., Stokowy, T., Zaczek, A. J. (2019). Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients. *Cancers*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010059>
- Markou, A., Farkona, S., Schiza, C., Efstathiou, T., Kounelis, S., Malamos, N., Lianidou, E. (2014). PIK3CA mutational status in circulating tumor cells can change during disease recurrence or progression in patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(22), 5823–34. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0149>
- Masuda, H., Baggerly, K. A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Meric-Bernstam, F., Ueno, N. T. (2013). Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(19), 5533–40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0799>
- Maturi, V., Morén, A., Enroth, S., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2018). Genomewide binding of transcription factor Snail1 in triple-negative breast cancer cells. *Molecular Oncology*, 12(7), 1153–1174. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12317>
- McDonald, J. A. (2018). Hair product use, age at menarche and mammographic breast density in multiethnic urban women. *Environmental Health*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0345-y>
- McGrail, D. J., Kieu, Q. M. N., & Dawson, M. R. (2014). The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft

- matrices through a mechanosensitive Rho-ROCK pathway. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 12), 2621–6. <https://doi.org/10.1242/jcs.144378>
- Mego, M., De Giorgi, U., Broglio, K., Dawood, S., Valero, V., Andreopoulou, E., Cristofanilli, M. (2009). Circulating tumour cells are associated with increased risk of venous thromboembolism in metastatic breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 101(11), 1813–6. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605413>
- Mendelsohn, J. (2002). Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(18 Suppl), 1S–13S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235219>
- Mesquita, B., Rothwell, D. G., Burt, D. J., Chemi, F., Fernandez-Gutierrez, F., Slane-Tan, D., Brady, G. (2017). Molecular analysis of single circulating tumour cells following long-term storage of clinical samples. *Molecular Oncology*, 11(12), 1687–1697. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12113>
- Mikhailova, M., Wang, Y., Bedolla, R., Lu, X.-H., Kreisberg, J. I., & Ghosh, P. M. (2008). AKT regulates androgen receptor-dependent growth and PSA expression in prostate cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 617, 397–405. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3\\_38](https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_38)
- Mina, A., Yoder, R., & Sharma, P. (2017). Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer: current perspectives. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10, 4675–4685. <https://doi.org/10.2147/OTT.S126051>
- Mitra, A., Mishra, L., & Li, S. (2015). EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*, 6(13), 10697–711. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4037>
- Mladinich, M., Ruan, D., & Chan, C.-H. (2016). Tackling Cancer Stem Cells via Inhibition of EMT Transcription Factors. *Stem Cells International*, 2016, 5285892. <https://doi.org/10.1155/2016/5285892>
- Mocellin, S., Hoon, D., Ambrosi, A., Nitti, D., & Rossi, C. R. (2006).

- The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(15), 4605–13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0823>
- Montagnana, M., Danese, E., Giudici, S., Franchi, M., Guidi, G. C., Plebani, M., & Lippi, G. (2011). HE4 in ovarian cancer: from discovery to clinical application. *Advances in Clinical Chemistry*, 55, 1–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126021>
- Mrklič, I., Pogorelič, Z., Capkun, V., & Tomić, S. (2013). Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochemica*, 115(4), 344–8. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.09.006>
- Muguti, G. I. (1993). Experience with breast cancer in Zimbabwe. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, 38(2), 75–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478837>
- Muinao, T., Deka Boruah, H. P., & Pal, M. (2018). Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells - An updated review. *Experimental Cell Research*, 362(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.018>
- Muinelo, L., Vieto, M., Abalo, A., Alonso Nocelo, M., Barón, F., Anido, U., Brozos, E., Vázquez, F., Aguin, S., Abal, M., López, R. (2014). Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment. *Cancers* 6(1), 153-165. <https://doi.org/10.3390/cancers6010153>
- Murphy, G., & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
- Nabholtz, J. M., Abrial, C., Mouret-Reynier, M. A., Dauplat, M. M., Weber, B., Gligorov, J., ... Penault-Llorca, F. (2014). Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab

- combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1570–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu183>
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., ... Yu, D. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6(2), 117–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.022>
- Nakamura, K., Terai, Y., Tanabe, A., Ono, Y. J., Hayashi, M., Maeda, K., ... Ohmichi, M. (2017). CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncology Reports*, 37(6), 3189–3200. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5583>
- Nakamura, T., Largaespada, D. A., Shaughnessy, J. D., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (1996). Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature Genetics*, 12(2), 149–53. <https://doi.org/10.1038/ng0296-149>
- Nalwoga, H., Arnes, J. B., Wabinga, H., & Akslen, L. A. (2010). Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *British Journal of Cancer*, 102(2), 369–75. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605488>
- Nasrazadani, A., Thomas, R. A., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2018). Precision Medicine in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8, 144. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00144>
- Neophytou, C., Boutsikos, P., & Papageorgis, P. (2018). Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 8, 31. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00031>
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews*.

- Cancer*, 9(4), 274–84. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>
- Ni, M., Chen, Y., Lim, E., Wimberly, H., Bailey, S. T., Imai, Y., ... Brown, M. (2011). Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*, 20(1), 119–31. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.026>
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., ... Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(16), 5367–74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>
- Nieto, M. A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 347–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer. (1995). *JAMA*, 273(6), 491–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7837369>
- Norris, J. D., Ellison, S. J., Baker, J. G., Stagg, D. B., Wardell, S. E., Park, S., ... McDonnell, D. P. (2017). Androgen receptor antagonism drives cytochrome P450 17A1 inhibitor efficacy in prostate cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(6), 2326–2338. <https://doi.org/10.1172/JCI87328>
- O'Brien, K. M., Cole, S. R., Tse, C.-K., Perou, C. M., Carey, L. A., Foulkes, W. D., Millikan, R. C. (2010). Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(24), 6100–10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1533>
- O'Connor, C. J., Chen, T., González, I., Cao, D., & Peng, Y. (2018). Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomarkers in Medicine*, 12(7),

- 813–820. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0398>
- O’Shaughnessy, J., Romieu, G., Diéras, V., Byrtek, M., Duenne, A.-A., & Miles, D. (2010). Meta-Analysis of Patients with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) from Three Randomized Trials of First-Line Bevacizumab (BV) and Chemotherapy Treatment for Metastatic Breast Cancer (MBC). *Cancer Research*, *70*(24 Supplement), P6-12-3-P6-12-3. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS10-P6-12-03>
- Obermayr, E., Bednarz-Knoll, N., Orsetti, B., Weier, H.-U., Lambrechts, S., Castillo-Tong, D. C., ... Brandt, B. (2017). Circulating tumor cells: potential markers of minimal residual disease in ovarian cancer? a study of the OVCAD consortium. *Oncotarget*, *8*(63), 106415–106428. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22468>
- Obermayr, E., Castillo-Tong, D. C., Pils, D., Speiser, P., Braicu, I., Van Gorp, T., Zeillinger, R. (2013). Molecular characterization of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer improves their prognostic significance -- a study of the OVCAD consortium. *Gynecologic Oncology*, *128*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.09.021>
- Obermayr, E., Sanchez-Cabo, F., Tea, M.-K. M., Singer, C. F., Krainer, M., Fischer, M. B., Zeillinger, R. (2010). Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer*, *10*, 666. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-666>
- Oh, W. K., Vargas, R., Jacobus, S., Leitzel, K., Regan, M. M., Hamer, P., ... Lipton, A. (2011). Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer*, *117*(3), 517–25. <https://doi.org/10.1002/cncr.25394>
- Omar, O. M., Soutto, M., Bhat, N. S., Bhat, A. A., Lu, H., Chen, Z., & El-Rifai, W. (2018). TFF1 antagonizes TIMP-1 mediated proliferative functions in gastric cancer. *Molecular Carcinogenesis*, *57*(11), 1577–1587. <https://doi.org/10.1002/mc.22880>
- Omarini, C., Guaitoli, G., Pipitone, S., Moscetti, L., Cortesi, L.,

- Cascinu, S., & Piacentini, F. (2018). Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. *Cancer Management and Research, Volume 10*, 91–103. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S146658>
- Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T., & Mukesh, B. N. (2009). Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical Medicine & Research*, 7(1–2), 4–13. <https://doi.org/10.3121/cmr.2009.825>
- Panoff, J. E., Hurley, J., Takita, C., Reis, I. M., Zhao, W., Sujoy, V., Wright, J. L. (2011). Risk of locoregional recurrence by receptor status in breast cancer patients receiving modern systemic therapy and post-mastectomy radiation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(3), 899–906. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1495-1>
- Pantel, Klaus; Alix-panabières, C. (2015). Cell lines from circulating tumor cells. *Oncoscience*, 815. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.195>
- Pantel, K., & Speicher, M. R. (2016). The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*, 35(10), 1216–24. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.192>
- Paoletti, C., Cani, A. K., Larios, J. M., Hovelson, D. H., Aung, K., Darga, E. P., Tomlins, S. A. (2018). Comprehensive Mutation and Copy Number Profiling in Archived Circulating Breast Cancer Tumor Cells Documents Heterogeneous Resistance Mechanisms. *Cancer Research*, 78(4), 1110–1122. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2686>
- Papa, A., Caruso, D., Strudel, M., Tomao, S., & Tomao, F. (2016). Update on Poly-ADP-ribose polymerase inhibition for ovarian cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, 14, 267. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1027-1>
- Papadaki, M. A., Kallergi, G., Zafeiriou, Z., Manouras, L., Theodoropoulos, P. A., Mavroudis, D., ... Agelaki, S. (2014). Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. *BMC*

- Cancer*, 14, 651. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-651>
- Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer*, 2, 16036. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36>
- Park, S., Koo, J., Park, H. S., Kim, J.-H., Choi, S.-Y., Lee, J. H., Lee, K. S. (2010). Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 21(3), 488–92. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp510>
- Pavloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S., & Hawkesq, S. P. (1992). A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 17321–1247326.
- Peeters, D. J. E., De Laere, B., Van den Eynden, G. G., Van Laere, S. J., Rothé, F., Ignatiadis, M., Dirix, L. Y. (2013). Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *British Journal of Cancer*, 108(6), 1358–1367. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.92>
- Pereira-Veiga, T., Abreu, M., Robledo, D., Matias-Guiu, X., Santacana, M., Sánchez, L., Costa, C. (2018). CTCs-derived xenograft development in a Triple Negative breast cancer case. *International Journal of Cancer*. 144(9): 2254-2265 <https://doi.org/10.1002/ijc.32001>
- Perou, C. M. (2010). Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist*, 15(Supplement 5), 39–48. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-S5-39>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Pestrin, M., Salvianti, F., Galardi, F., De Luca, F., Turner, N., Malorni, L., Pinzani, P. (2015). Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Molecular Oncology*,

- 9(4), 749–57. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.12.001>
- Peter Leung Peter Leung Eli Adashi. (2003). *The Ovary*. Elsevier.
- Peter Schmid, Yeon Hee Park, Eva Muñoz-Couselo, Sung-Bae Kim, Joohyuk Sohn, S.-A. I. (2017). Pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) as neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer (TNBC): Preliminary results from KEYNOTE-173. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 556–556.
- Petrelli, F., Cabiddu, M., Coiru, A., Borgonovo, K., Ghilardi, M., Lonati, V., & Barni, S. (2015). Adjuvant dose-dense chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Breast Cancer Research and Treatment*, 151(2), 251–9. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3405-4>
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 265–73. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Porter, J. F., Shen, S., & Denhardt, D. T. (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *British Journal of Cancer*, 90(2), 463–470. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601533>
- Poveda, A. (2005). Ovarian cancer: is the news good enough? *International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 15 Suppl 3, 298–306. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00445.x>
- Poveda, A., Vergote, I., Tjulandin, S., Kong, B., Roy, M., Chan, S., ... Monk, B. J. (2011). Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6-12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(1), 39–48. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq352>
- Powell, E., Shao, J., Yuan, Y., Chen, H.-C., Cai, S., Echeverria, G. V., Piwnica-Worms, H. (2016). p53 deficiency linked to B cell translocation gene 2 (BTG2) loss enhances metastatic potential by promoting tumor growth in primary and metastatic sites in

- patient-derived xenograft (PDX) models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 18(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0673-9>
- Pradeep, S., Kim, S. W., Wu, S. Y., Nishimura, M., Chaluvally-Raghavan, P., Miyake, T., ... Sood, A. K. (2014). Hematogenous metastasis of ovarian cancer: rethinking mode of spread. *Cancer Cell*, 26(1), 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.002>
- Qu, Q., Mao, Y., Xiao, G., Fei, X., Wang, J., Zhang, Y., ... Shen, K. (2015). USP2 promotes cell migration and invasion in triple negative breast cancer cell lines. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(7), 5415–23. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3207-7>
- Rahbari, N. N., Aigner, M., Thorlund, K., Mollberg, N., Motschall, E., Jensen, K., ... Weitz, J. (2010). Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(5), 1714–26. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.008>
- Rakha, E. A., Putti, T. C., Abd El-Rehim, D. M., Paish, C., Green, A. R., Powe, D. G., Ellis, I. O. (2006). Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology*, 208(4), 495–506. <https://doi.org/10.1002/path.1916>
- Rangel, M. C., Bertolette, D., Castro, N. P., Klauzinska, M., Cuttitta, F., & Salomon, D. S. (2016). Developmental signaling pathways regulating mammary stem cells and contributing to the etiology of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 156(2), 211–26. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3746-7>
- Rantalainen, M. (2018). Application of single-cell sequencing in human cancer. *Briefings in Functional Genomics*, 17(4), 273–282. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elx036>
- Ree, A. H., Flørenes, V. A., Berg, J. P., Mælandsmo, G. M., Nesland, J. M., & Fodstad, Ø. (1997). High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of

- distant metastases. *Clinical Cancer Research*, 3(9), 1623–1628.
- Reid, B. M., Permuth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
- Rein, B. J. D., Gupta, S., Dada, R., Safi, J., Michener, C., & Agarwal, A. (2011). Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer. *Journal of Oncology*, 2011, 475983. <https://doi.org/10.1155/2011/475983>
- Reinisch, M., Ataseven, B., & Kümmel, S. (2016). Neoadjuvant Dose-Dense and Dose-Intensified Chemotherapy in Breast Cancer - Review of the Literature. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 11(1), 13–20. <https://doi.org/10.1159/000444543>
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(4), 659–72. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1457-3>
- Riethdorf, S., Müller, V., Loibl, S., Nekljudova, V., Weber, K., Huober, J., Pantel, K. (2017). Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells for Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant “Geparquattro” Trial. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(18), 5384–5393. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0255>
- Riva, F., Bidard, F.-C., Houy, A., Saliou, A., Madic, J., Rampanou, A., Pierga, J.-Y. (2017). Patient-Specific Circulating Tumor DNA Detection during Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Chemistry*, 63(3), 691–699. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262337>
- Rooth, C. (2013). Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)*, 22(17), S23-30. <https://doi.org/10.12968/bjon.2013.22.Sup17.S23>
- Roth, B., Jayaratna, I., Sundi, D., Cheng, T., Melquist, J., Choi, W., Dinney, C. (2017). Employing an orthotopic model to study the role of epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer metastasis. *Oncotarget*, 8(21), 34205–34222. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11009>

- Saraiva, D. P., Guadalupe Cabral, M., Jacinto, A., & Braga, S. (2017). How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. *ESMO Open*, 2(4), e000208. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000208>
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, 68(4), 989–97. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2017>
- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T. G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E. L., Dyer, M. J. (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*, 98(12), 3413–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719382>
- Schmidt, J. M., Panzilius, E., Bartsch, H. S., Irmeler, M., Beckers, J., Kari, V., Scheel, C. H. (2015). Stem-cell-like properties and epithelial plasticity arise as stable traits after transient Twist1 activation. *Cell Reports*, 10(2), 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.032>
- Schröpfer, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J., Feix, S., & Anacker, J. (2010). Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer*, 10(1), 553. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-553>
- Seetharam, M., Kolla, K. R., & Chawla, S. P. (2018). Eribulin therapy for the treatment of patients with advanced soft tissue sarcoma. *Future Oncology (London, England)*. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0461>
- Seewaldt, V. L., & Scott, V. (2007). Rapid Progression of Basal-Type Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(13), e12. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm063760>
- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>

- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237552>
- Shamir, E. R., Pappalardo, E., Jorgens, D. M., Coutinho, K., Tsai, W.-T., Aziz, K., Ewald, A. J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *The Journal of Cell Biology*, 204(5), 839–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306088>
- Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 21(9), 1050–62. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0067>
- Shaw, T. J., Senterman, M. K., Dawson, K., Crane, C. A., & Vanderhyden, B. C. (2004). Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(6), 1032–42. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.013>
- Shen, Y., Yang, F., Zhang, W., Song, W., Liu, Y., & Guan, X. (2017). The Androgen Receptor Promotes Cellular Proliferation by Suppression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 43(5), 2047–2061. <https://doi.org/10.1159/000484187>
- Shima, H., Yamada, A., Ishikawa, T., & Endo, I. (2017). Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy? *Gland Surgery*, 6(1), 82–88. <https://doi.org/10.21037/gs.2016.08.03>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Sikov, W. M., Berry, D. A., Perou, C. M., Singh, B., Cirrincione, C. T., Tolaney, S. M., ... Winer, E. P. (2015). Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete

- Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (A. *Journal of Clinical Oncology*, 33(1), 13–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
- Simon, I., Zhuo, S., Corral, L., Diamandis, E. P., Sarno, M. J., Wolfert, R. L., & Kim, N. W. (2006). B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Research*, 66(3), 1570–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3550>
- Siziopikou, K. P., & Cobleigh, M. (2007). The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 16(1), 104–7. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2006.09.003>
- Song, G., Xu, S., Zhang, H., Wang, Y., Xiao, C., Jiang, T., ... Wang, X. (2016). TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 35(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0427-7>
- Song, T., Dou, C., Jia, Y., Tu, K., & Zheng, X. (2015). TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6(14), 12061–79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3616>
- Song, Y., Tian, T., Shi, Y., Liu, W., Zou, Y., Khajvand, T., ... Yang, C. (2017). Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells. *Chemical Science*, 8(3), 1736–1751. <https://doi.org/10.1039/C6SC04671A>
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ... Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Sotiriou, C., Neo, S.-Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., ... Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-

- based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10393–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>
- Srivastava, A. K., Rizvi, A., Cui, T., Han, C., Banerjee, A., Naseem, I., Wang, Q.-E. (2018). Depleting ovarian cancer stem cells with calcitriol. *Oncotarget*, 9(18), 14481–14491. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24520>
- Stead, L. A., Lash, T. L., Sobieraj, J. E., Chi, D. D., Westrup, J. L., Charlot, M., ... Rosenberg, C. L. (2009). Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast Cancer Research: BCR*, 11(2), R18. <https://doi.org/10.1186/bcr2242>
- Stefanovic, S., Deutsch, T. M., Wirtz, R., Hartkopf, A., Sinn, P., Schuetz, F., Wallwiener, M. (2019). Molecular Subtype Conversion between Primary and Metastatic Breast Cancer Corresponding to the Dynamics of Apoptotic and Intact Circulating Tumor Cells. *Cancers*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cancers11030342>
- Stefansson, O. A., Villanueva, A., Vidal, A., Martí, L., & Esteller, M. (2012). BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics*, 7(11), 1225–1229. <https://doi.org/10.4161/epi.22561>
- Steffensen, K. D., Waldstrøm, M., Christensen, R. K., Bartels, A., Brünner, N., & Jakobsen, A. (2010). Lack of relationship between TIMP-1 tumour cell immunoreactivity, treatment efficacy and prognosis in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*, 10, 185. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-185>
- Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, 462(7276), 1005–1010. <https://doi.org/10.1038/nature08645>
- Stetler-stevenson, W. G., Kruttsch, H. C., & Liotta, L. A. (1989). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-2). *Journal of Biological Chemistry*, (29), 17374–17378.

- [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9\\_101950-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101950-1)
- Strizzi, L., Postovit, L.-M., Margaryan, N. V, Seftor, E. A., Abbott, D. E., Seftor, R. E. B., ... Hendrix, M. J. C. (2008). Emerging roles of nodal and Cripto-1: from embryogenesis to breast cancer progression. *Breast Disease*, 29, 91–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029628>
- Swenson, R. R., Rizzo, C. J., Brown, L. K., Payne, N., DiClemente, R. J., Salazar, L. F., Hennessy, M. (2009). Prevalence and correlates of HIV testing among sexually active African American adolescents in 4 US cities. *Sexually Transmitted Diseases*, 36(9), 584–91. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181b4704c>
- Szynglarewicz, B., Kasprzak, P., Donizy, P., Biecek, P., Halon, A., & Matkowski, R. (2017). Epithelial-mesenchymal transition inducer Snail1 and invasive potential of intraductal breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 116(6), 696–705. <https://doi.org/10.1002/jso.24708>
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- Tamir, A., Jag, U., Sarojini, S., Schindewolf, C., Tanaka, T., Gharbaran, R., ... Suh, K. S. (2014). Kallikrein family proteases KLK6 and KLK7 are potential early detection and diagnostic biomarkers for serous and papillary serous ovarian cancer subtypes. *Journal of Ovarian Research*, 7, 109. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0109-z>
- Tao, F., Tian, X., Lu, M., & Zhang, Z. (2018). A novel lncRNA, Lnc-OC1, promotes ovarian cancer cell proliferation and migration by sponging miR-34a and miR-34c. *Journal of Genetics and Genomics*, 45(3), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.03.001>
- Taube, M. E., Liu, X.-W., Fridman, R., & Kim, H.-R. C. (2006). TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Oncogene*, 25(21), 3041–8. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209336>

- Teles RHG, Moralles HF, C. M. (2018). Global trends in nanomedicine research on triple negative breast cancer: a bibliometric analysis. *Int J Nanomedicine*, *13*, 2321–2336.
- Telli, M. L., Jensen, K. C., Vinayak, S., Kurian, A. W., Lipson, J. A., Flaherty, P. J., Ford, J. M. (2015). Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(17), 1895–901. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0085>
- Telli, M. L., Timms, K. M., Reid, J., Hennessy, B., Mills, G. B., Jensen, K. C., Richardson, A. L. (2016). Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *22*(15), 3764–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2477>
- Testa, U., Petrucci, E., Pasquini, L., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines (Basel, Switzerland)*, *5*(1). <https://doi.org/10.3390/medicines5010016>
- Thiagarajan, P. S., Sinyuk, M., Turaga, S. M., Mulkearns-Hubert, E. E., Hale, J. S., Rao, V., ... Lathia, J. D. (2018). Cx26 drives self-renewal in triple-negative breast cancer via interaction with NANOG and focal adhesion kinase. *Nature Communications*, *9*(1), 578. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02938-1>
- Thike, A. A., Yong-Zheng Chong, L., Cheok, P. Y., Li, H. H., Wai-Cheong Yip, G., Huat Bay, B., ... Tan, P. H. (2014). Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *27*(3), 352–60.

- <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.145>
- Thomssen, C., Pierga, J.-Y., Pritchard, K. I., Biganzoli, L., Cortes-Funes, H., Petráková, K., Smith, I. (2012). First-line bevacizumab-containing therapy for triple-negative breast cancer: analysis of 585 patients treated in the ATHENA study. *Oncology*, 82(4), 218–27. <https://doi.org/10.1159/000336892>
- Trimbos, J. B., Parmar, M., Vergote, I., Guthrie, D., Bolis, G., Colombo, N., ... European Organisation for Research and Treatment of Cancer Collaborators-Adjuvant ChemoTherapy un Ovarian Neoplasm. (2003). International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), 105–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529343>
- Tripathi, S. C., Peters, H. L., Taguchi, A., Katayama, H., Wang, H., Momin, A., Ostrin, E. J. (2016). Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1555–E1564. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521812113>
- Tsang, J., Li, V., Lai, E., Au, G., & Chua, D. (2009). Triple Negative Breast Cancer Patients with Brain Metastasis Are Associated with More Concurrent Lung Metastases. *Cancer Research*, 69(24 Supplement), 3072–3072. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS-09-3072>
- Tse, G. M., Tan, P.-H., Lau, K.-M., de Andrade, V. P., Lui, P. C. W., Vong, J. S., Moriya, T. (2009). Breast cancer in the elderly: a histological assessment. *Histopathology*, 55(4), 441–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2009.03400.x>
- Tucci, M., Zichi, C., Buttigliero, C., Vignani, F., Scagliotti, G. V, & Di Maio, M. (2018). Enzalutamide-resistant castration-resistant prostate cancer: challenges and solutions. *OncoTargets and Therapy*, 11, 7353–7368. <https://doi.org/10.2147/OTT.S153764>
- Tulley, S., Zhao, Q., Dong, H., Pearl, M. L., & Chen, W.-T. (2016).

- Vita-Assay™ Method of Enrichment and Identification of Circulating Cancer Cells/Circulating Tumor Cells (CTCs). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1406, 107–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3444-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3444-7_9)
- Turdo, F., Bianchi, F., Gasparini, P., Sandri, M., Sasso, M., De Cecco, L., Campiglio, M. (2016). CDCP1 is a novel marker of the most aggressive human triple-negative breast cancers. *Oncotarget*, 7(43), 69649–69665. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11935>
- Untch, M., Jackisch, C., Schneeweiss, A., Conrad, B., Aktas, B., Denkert, C., von Minckwitz, G. (2016). Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto—GBG 69): a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(3), 345–356. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00542-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00542-2)
- Vallejos, C. S., Gómez, H. L., Cruz, W. R., Pinto, J. A., Dyer, R. R., Velarde, R., Vigil, C. E. (2010). Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clinical Breast Cancer*, 10(4), 294–300. <https://doi.org/10.3816/CBC.2010.n.038>
- Van Gorp, T., Cadron, I., Despierre, E., Daemen, A., Leunen, K., Amant, F., Vergote, I. (2011). HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *British Journal of Cancer*, 104(5), 863–70. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606092>
- Vaz, A. P., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2013). Cancer stem cells and therapeutic targets: an emerging field for cancer treatment. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(2), 113–20. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0095-x>
- Vergara, D., Merlot, B., Lucot, J.-P., Collinet, P., Vinatier, D., Fournier, I., & Salzet, M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Letters*, 291(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.017>
- Vergote, I., van Gorp, T., Amant, F., Neven, P., & Berteloot, P. (2005). Neoadjuvant chemotherapy for ovarian cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 19(12), 1615-22-30. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16396153>
- Verma, S., Provencher, L., & Dent, R. (2011). Emerging trends in the treatment of triple-negative breast cancer in Canada: a survey. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 18(4), 180–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21874117>
- Vetter, M. H., & Hays, J. L. (2018). Use of Targeted Therapeutics in Epithelial Ovarian Cancer: A Review of Current Literature and Future Directions. *Clinical Therapeutics*, 40(3), 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.01.012>
- Vierkant, R. A., Degen, A. C., Radisky, D. C., Visscher, D. W., Heinzen, E. P., Frank, R. D., Vachon, C. M. (2017). Mammographic breast density and risk of breast cancer in women with atypical hyperplasia: An observational cohort study from the Mayo Clinic Benign Breast Disease (BBD) cohort. *BMC Cancer*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3082-2>
- Vinay Kumar, Abul K. Abbas, J. C. A. (2015). *Robbins Y Cotran. Patología Estructural Y Funcional*. Elsevier.
- Vona-Davis, L., Rose, D. P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J., & Hobbs, G. (2008). Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(12), 3319–24. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0544>
- von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Rezai, M., Fasching, P. A., Tesch, H., Eggemann, H., Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie–Breast Study Groups. (2012). Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(4), 299–309. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1111065>
- von Minckwitz, G., & Martin, M. (2012). Neoadjuvant treatments for triple-negative breast cancer (TNBC). *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 6, vi35-9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds193>
- von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C.,

- Rezai, M., Untch, M. (2014). Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, *15*(7), 747–56. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)
- Vorotnikova, E., Tries, M., & Braunhut, S. (2004). Retinoids and TIMP1 prevent radiation-induced apoptosis of capillary endothelial cells. *Radiation Research*, *161*(2), 174–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731072>
- Wang, H., Wang, L., Song, Y., Wang, S., Huang, X., Xuan, Q., ... Zhang, Q. (2017). CD44+/CD24- phenotype predicts a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, *14*(5), 5890–5898. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6959>
- Wang, K., Guan, C., Fang, C., Jin, X., Yu, J., Zhang, Y., & Zheng, L. (2018). Clinical significance and prognostic value of Forkhead box A1 expression in human epithelial ovarian cancer. *Oncology Letters*, *15*(4), 4457–4462. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7899>
- Wang, L., Balasubramanian, P., Chen, A. P., Kummar, S., Evrard, Y. A., & Kinders, R. J. (2016). Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Seminars in Oncology*, *43*(4), 464–75. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.06.004>
- Wei, B., Wang, J., Bourne, P., Yang, Q., Hicks, D., Bu, H., & Tang, P. (2008). Bone metastasis is strongly associated with estrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative breast carcinomas. *Human Pathology*, *39*(12), 1809–15. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.05.010>
- Wend, P., Runke, S., Wend, K., Anchondo, B., Yesayan, M., Jardon, M., Miranda-Carboni, G. A. (2013). WNT10B/ $\beta$ -catenin signalling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(2), 264–79. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201320>
- Whipple, R. A., Cheung, A. M., & Martin, S. S. (2007). Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Experimental Cell Research*, *313*(7), 1326–36. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.02.001>

- Würtz, S. O., Schrohl, A.-S., Mouridsen, H., & Brüner, N. (2008). TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 47(4), 580–90. <https://doi.org/10.1080/02841860802022976>
- Wysocki, P. J., Korski, K., Lamperska, K., Zaluski, J., & Mackiewicz, A. (2008). Primary resistance to docetaxel-based chemotherapy in metastatic breast cancer patients correlates with a high frequency of BRCA1 mutations. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 14(7), SC7-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591931>
- Xu, L., Jia, S., Li, H., Yu, Y., Liu, G., Wu, Y., ... Sheng, Y. (2018). Characterization of circulating tumor cells in newly diagnosed breast cancer. *Oncology Letters*, 15(2), 2522–2528. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7540>
- Xu, L., Li, H., Su, L., Lu, Q., & Liu, Z. (2017). MicroRNA-455 inhibits cell proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer by directly targeting Notch1. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9777–9785. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7790>
- Xu, Y., Hou, Y., Liu, T., & Lou, G. (2018). Overexpression and clinical significance of IBP in epithelial ovarian carcinoma. *Oncology Letters*, 15(5), 6604–6610. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8125>
- Yamashita, N., Tokunaga, E., Kitao, H., Hisamatsu, Y., Taketani, K., Akiyoshi, S., ... Maehara, Y. (2013). Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(5), 739–46. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1376-6>
- Yan, W.-T., Cui, X., Chen, Q., Li, Y.-F., Cui, Y.-H., Wang, Y., & Jiang, J. (2017). Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 7, 43464. <https://doi.org/10.1038/srep43464>
- Yang, F., Aubele, M., Walch, A., Gross, E., Napieralski, R., Zhao, S., ... Schmitt, M. (2017). Tissue kallikrein-related peptidase 4 (KLK4), a novel biomarker in triple-negative breast cancer.

- Biological Chemistry*, 398(10), 1151–1164.  
<https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0122>
- Yang, Q., Fung, K.-M., Day, W. V, Kropp, B. P., & Lin, H.-K. (2005). Androgen receptor signaling is required for androgen-sensitive human prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Cell International*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-8>
- Yap, T. A., Sandhu, S. K., Carden, C. P., & de Bono, J. S. (2018). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(1), 31–49. <https://doi.org/10.3322/caac.20095>
- Ye, F., Qiu, Y., Li, L., Yang, L., Cheng, F., Zhang, H., ... Bu, H. (2015). The Presence of EpCAM(-)/CD49f(+) Cells in Breast Cancer Is Associated with a Poor Clinical Outcome. *Journal of Breast Cancer*, 18(3), 242–8. <https://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.3.242>
- Yeung, T.-L., Leung, C. S., Yip, K.-P., Au Yeung, C. L., Wong, S. T. C., & Mok, S. C. (2015). Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 309(7), C444-56. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2015>
- Yin, J., Wang, Z., Li, G., Lin, F., Shao, K., Cao, B., & Hou, Y. (2019). Characterization of circulating tumor cells in breast cancer patients by spiral microfluidics. *Cell Biology and Toxicology*, 35(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-09454-4>
- Yin, W.-J., Lu, J.-S., Di, G.-H., Lin, Y.-P., Zhou, L.-H., Liu, G.-Y., Shao, Z.-M. (2009). Clinicopathological features of the triple-negative tumors in Chinese breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(2), 325–33. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0096-0>
- Yoshiji, H., Gomez, D. E., & Thorgeirsson, U. P. (1996). Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 69(2), 131–4. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

- 0215(19960422)69:2<131::AID-IJC11>3.0.CO;2-C
- Young, R. C. (2003). Early-Stage Ovarian Cancer: To Treat or Not To Treat. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), 94–95. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.94>
- Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M. W., Donaldson, M. C., Haber, D. A. (2014). Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6193), 216–20. <https://doi.org/10.1126/science.1253533>
- Yu, S., Murph, M. M., Lu, Y., Liu, S., Hall, H. S., Liu, J., ... Mills, G. B. (2008). Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(22), 1630–42. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn378>
- Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., & Greene, M. I. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2051–8. <https://doi.org/10.1172/JCI32278>
- Zhang, J., Chang, B., & Liu, J. (2013). CD44 standard form expression is correlated with high-grade and advanced-stage ovarian carcinoma but not prognosis. *Human Pathology*, 44(9), 1882–9. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.02.016>
- Zhang, L., Ridgway, L. D., Wetzel, M. D., Ngo, J., Yin, W., Kumar, D., Marchetti, D. (2013). The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Science Translational Medicine*, 5(180), 180ra48-180ra48. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005109>
- Zhang, L., Riethdorf, S., Wu, G., Wang, T., Yang, K., Peng, G., Pantel, K. (2012). Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5701–10. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1587>
- Zhang, Y., Lv, Y., Niu, Y., Su, H., & Feng, A. (2017). Role of Circulating Tumor Cell (CTC) Monitoring in Evaluating Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer Patients in China.

- Medical Science Monitor*, 23, 3071–3079.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.902637>
- Zheng, B., Geng, L., Zeng, L., Liu, F., & Huang, Q. (2018). AKT2 contributes to increase ovarian cancer cell migration and invasion through the AKT2-PKM2-STAT3/NF- $\kappa$ B axis. *Cellular Signalling*, 45, 122–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.01.021>
- Zheng, H., Zhang, L., Zhao, Y., Yang, D., Song, F., Wen, Y., Chen, K. (2013). Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *PloS One*, 8(11), e77853.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077853>
- Zheng, L., Li, L., Lu, Y., Jiang, F., & Yang, X.-A. (2018). SREBP2 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 243(7), 655–662. <https://doi.org/10.1177/1535370218760283>
- Zhou, S., Sun, X., Yu, L., Zhou, R., Li, A., Li, M., & Yang, W. (2018). Differential expression and clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers among different histological types of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer*, 9(3), 604–613. <https://doi.org/10.7150/jca.19190>
- Zhou, Y., Bian, B., Yuan, X., Xie, G., Ma, Y., & Shen, L. (2015). Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PloS One*, 10(6), e0130873.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130873>



## 8-AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, primeramente, comenzar con el agradecimiento a mis directores, gracias a los tres por haber confiado en mi desde el principio abriéndome las puertas al mundo de la investigación biomédica.

Gracias **Rafa** por tu labor en la promoción de la investigación, imprescindible.

Gracias **Laura Sánchez** por tu ayuda constante, por tus buenas palabras, por tu amabilidad, por tus consejos, por tus ánimos y tu alegría. Un claro ejemplo de una persona que ha llegado a lo más alto sin perder un átomo de humanidad, para mi un ejemplo a seguir.

Por último gracias **Laura Muinelo** por tu ayuda completamente imprescindible, sin ti esta tesis no existiría, gracias por tu paciencia, tu entrega, tu esfuerzo, tu implicación y tu afán de mejora continua. Un ejemplo de una persona que se gana día a día el ser una investigadora con todas la letras y cuya capacidad de trabajo supera a la de cualquier otra persona que yo haya conocido. Por último, es para mi importante decir que, tras estos años, considero que además de haber sido mi directora será para siempre una buena amiga.

Gracias a **Alicia**, la mejor técnico que existe. Desde el primer hasta el último día has hecho todo lo posible para que me sintiese cómodo en el laboratorio, una suerte para el grupo poder contar contigo y para mi un honor el haber trabajado contigo y aprendido de ti.

Gracias **Ramón**, otro profesional impresionante, gracias por tu humildad, por tu buen humor, por tu simpatía innata, por tus amplísimos conocimientos biológicos, de los cuales he podido aprender un montón y por estar disponible para ayudar siempre.

Gracias a **Oscar**, nuestro odontólogo particular, gracias por tu amabilidad y saber estar, has sido siempre un gran compañero y estoy

seguro que conseguirás lo que quieras. Muchas gracias también por haber sido una compañía tan agradable en Montpellier y por último por siempre resolver mis dudas de dientes.

Gracias **Thais**, por su ayuda en tantas y tantas ocasiones, por tus consejos y ánimos. Al igual que Oscar, muchísimas gracias también por haber sido una compañía tan agradable en Montpellier y en tu caso también en Lisboa. Por otra parte tampoco olvido la guía que me hiciste para conocer muchos de los rincones de Barcelona, una pasada, muchas gracias de nuevo.

Gracias también a **Carmen**, otra técnico de categoría. Siempre amable y profesional. Un placer haber coincidido contigo estos años.

Gracias a **Miguel**, primeramente por haberme permitido formar parte de tu grupo y también por siempre tener algún comentario gracioso, por sus palabras de ánimo y porque de no ser por el ONCOMET seguramente no existiría.

Gracias a **Lorena** por ser genial conmigo desde el primer día, por ayudarme siempre con eficacia y rapidez. No hay una sola duda que te haya planteado que no me hayas resuelto. Un grandísima compañera, siempre de buen humor, siempre con buenas palabras y dispuesta a colaborar desinteresadamente. Junto con Lorena me gustaría darle las gracias a **Alba** por su ayuda en el animalario y por estar, como he comentado sobre Lorena, siempre dispuesta a enseñar a los demás.

Gracias a **Alexandre** el empresario del grupo, para mi un super-crack desde el día uno, con eso poco más que decir.

Gracias a **Carolina** y a **Carlos** por ser tan majos siempre. Seréis con seguridad unos excelentes investigadores, se os nota pasión por la ciencia y considero que esa es una de las claves más importante para alcanzar el éxito. Gracias también por invitarme mil veces a vuestras cenas, fiestas y reuniones. Ya sabéis que la noche no es lo que más me gusta, pero muchas gracias por haber contado conmigo. Me gustaría

citar junto a ellos a **Aitor**, siempre trabajador, amable y con una sonrisa en la cara, muchas gracias a ti también.

Gracias a **Patricia** por tu sonrisa eterna, un soplo de aire fresco desde el día que llegó a trabajar con nosotros. Gracias también por tu ayuda, tus palabras de ánimo y tus consejos.

Gracias a **Roberto** principalmente por tu humildad, ya que pese a sus conocimientos, experiencia y trayectoria profesional, eres una persona muy sencilla y cercana. Gracias a ti también, por sus palabras de ánimo y tus buenos consejos.

Gracias a mis compañeras de endocrinología **Cecilia, Silvia, Cintia Verónica** y a su jefa **Sisi**. Una suerte inmensa el haber sido vuestro compañero, sois un grupo de investigación excelente y unas mejores personas. Por otra parte me gustaría darle las gracias a **Sonia** de cardiología, por ser desde el día uno tan amable conmigo, muchas gracias.

Para ir terminando, me gustaría dar las gracias a tres personas, para mí muy importantes: **Juan José Pasantes, Paloma Morán y Concepción de la Hera**. Mi tutor del grado, mi directora de TFG y mi directora de TFM respectivamente. Tres excelentes personas y profesores y que han sabido transmitirme su pasión por la genética desde la primera clase.

Gracias **Lupi** por estar ahí siempre y ser siempre mi mejor amiga. Muchas gracias.

Por último, gracias a mis padres **Pilar y Manuel** ya que considero que ellos son la parte más importante de la ecuación para que yo haya llegado hasta aquí. Muchas gracias.

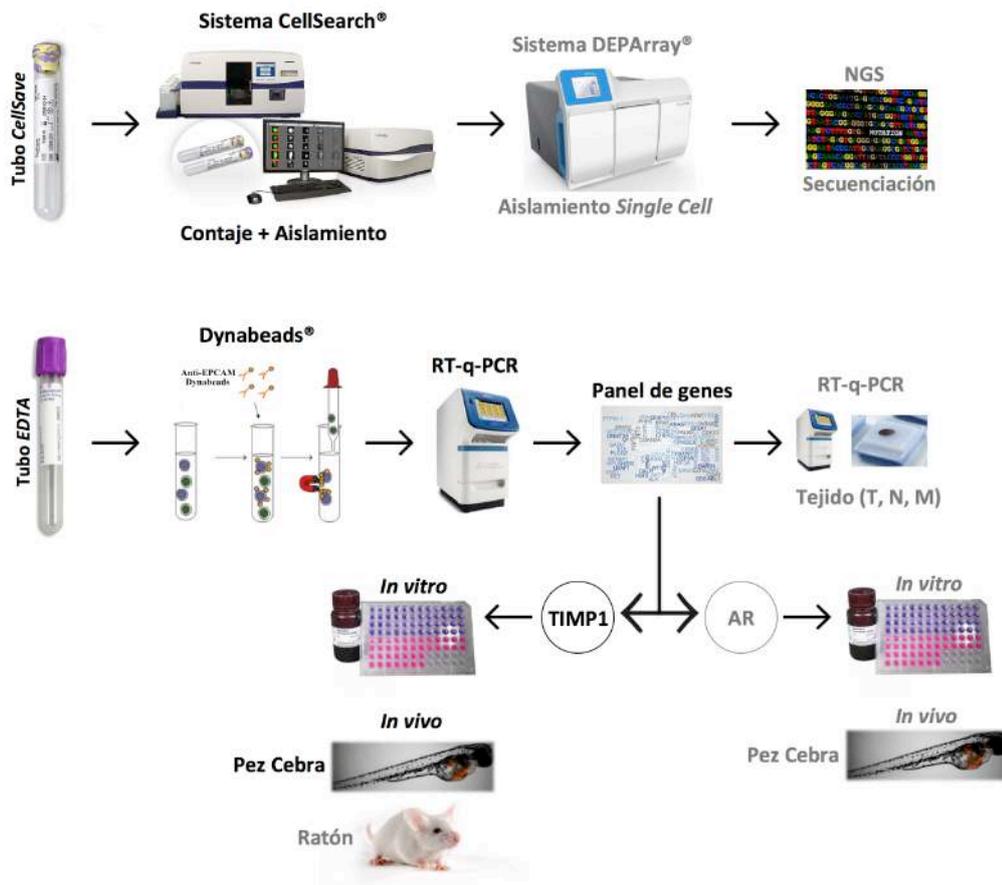


## 9-ACLARACIONES

### 9.1- Detalle de los diseños utilizados en los diferentes sub-estudios.

Primeramente, me gustaría presentar un esquema explicativo de los ensayos llevados a cabo en ambos sub-estudios: cáncer de mama triple negativo (CMTN) y cáncer de ovario avanzado (COA).

Los ensayos llevados a cabo en ambos sub-estudios se indican con **letra negra**, mientras que lo indicados en **letra gris** solamente se han realizado (por diferentes motivos, tanto económicos, como de falta de tiempo y de disponibilidad de muestra) en el estudio de CMTN.



Por otra parte, me gustaría aclarar los siguientes puntos:

- a) **Análisis mediante RT-q-PCR:** En todos los casos de análisis mediante RT-q-PCR se han llevado a cabo 3 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 3 veces.
- b) **Western-Blot:** En todos los casos de análisis por Western-Blot se han llevado a cabo 3 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 3 veces.
- c) **Proliferación relativa:** En todos los casos de análisis *in vitro* de proliferación relativa se han llevado a cabo 6 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 5 veces.
- d) **Clonogenicidad relativa:** En todos los casos de análisis *in vitro* de clonogenicidad relativa se han llevado a cabo 6 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 5 veces.
- e) **Migración relativa:** En todos los casos de análisis *in vitro* de migración relativa se han llevado a cabo 6 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 5 veces.
- f) **Adhesión a colágeno relativa:** En todos los casos de análisis *in vitro* de adhesión a colágeno relativa se han llevado a cabo 4 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 3 veces.
- g) **Toxicidad Carboplatino/Paclitaxel:** En el análisis *in vitro* de toxicidad Carboplatino/Paclitaxel se han llevado a cabo 3 replicados por cada ensayo y cada ensayo se ha realizado 3 veces.
- h) **Xénografit en Pez Cebra:** En todos los estudios de *xénografit* en Pez Cebra se han utilizado 15 embriones/condición y cada ensayo se ha realizado 3 veces.

- i) **Xénograft en Ratón:** En el estudio de *xénograft* en ratón se han utilizado 3 ratones/condición y cada ensayo se ha realizado 3 veces.

## 9.2- Definición de las variables que se recogen en los marcadores diagnósticos y pronósticos.

En el caso de los **marcadores diagnósticos**, se han determinado en base a los valores de expresión relativa de las muestras de controles y pacientes procedentes de los inmunoaislamientos EpCAM-dependientes indicados en los puntos de la tesis 4.1.2.1 (Figura 16) en el caso del apartado de cáncer de mama triple negativo y 4.2.2.1 (Figura 42) en el caso del apartado de cáncer de ovario avanzado.

En el caso de los modelos de diagnóstico se han obtenido mediante un modelo de regresión logística que combina los valores de expresión relativa de los distintos marcadores. Tras el análisis, hemos seleccionado los modelos que presentaban una mejor ratio de mayor área bajo curva / menor número de marcadores. Figura 19 en el caso del apartado de cáncer de mama triple negativo y figura 44 en el caso del apartado de cáncer de ovario avanzado.

En el caso de los **marcadores pronósticos**, se han determinado en base a los valores de expresión relativa de las muestras de pacientes procedentes de los inmunoaislamientos EpCAM-dependientes indicados en los puntos de la tesis 4.1.2.1 (Figura 16) en el caso del apartado de cáncer de mama triple negativo y 4.2.2.1 (Figura 42) en el caso del apartado de cáncer de ovario avanzado. Los valores fueron divididos en altos y bajos en función de percentil 70 para de este modo poder observar diferencia en cuanto a pronóstico entre las pacientes con alta y baja expresión relativa de cada uno de los marcadores estudiados.

Por otra parte cuando se habla de pronóstico y enumeración de células tumorales circulantes (CTC) se están utilizando los valores de conteo de CTC obtenidos mediante el sistema CellSearch, divididos en

menor que 5 CTC o mayor/igual que 5 CTC ya que es el punto de corte habitual establecido por la FDA. En cambio cuando se habla de pronóstico y *clusters* de CTC utilizamos simplemente la presencia o ausencia de los mismos, evaluada mediante el sistema CellSearch.

### **9.3- Análisis de supervivencia: indicación el evento analizado.**

En todos los casos de análisis de supervivencia se ha utilizado:

- a) Para supervivencia global (SG) el intervalo desde la toma de muestra hasta el **fallecimiento** de la paciente.
- b) Para supervivencia libre de progresión de la enfermedad (SLP) el intervalo desde la toma de muestra hasta el diagnóstico de **progresión de la enfermedad**.

