

Tesis doctoral 2021

**Evaluación de nuevas estrategias  
terapéuticas dirigidas al nicho  
tumoral en cáncer de mama triple  
negativo**

*Miriam Nuncia Cantarero*

Directora: Eva M. Galán Moya  
Co-director: Alberto Ocaña Fernández





A B R E V I A T U R A S





# Abreviaturas

AdMSC: MSC de tejido adiposo peritumoral (CAAT).

AdMSC<sup>TNBC</sup>: MSC de tejido adiposo peritumoral (CAAT) de pacientes con TNBC.

ADN: Ácido desoxiribunucleico

AECC: Asociación española contra el cáncer

AnV: Anexina V

ARN: Ácido ribunucleico

ARNm: ARN mensajero

ASC: Célula madre adiposa

ATCC: Colección americana de cultivos tipo

ATP: Adenosín trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

BET: proteínas de la familia de bromodominio y dominio extraterminal

CA-MSC:

CAAT: tejido adiposo asociado al tumor

CAF: fibroblastos asociados al cáncer

CCD: dominio de hélice superenrollada

CDDP: cisplatino o cis-diamminedichloroplatinum (II).

CDF1: factor-1 estimulante de colonias

CDK9: ciclina dependiente de quinasa 9

CHUA: Complejo hospitalario universitario de Albacete

CK: citoqueratinas

COLVI: colágeno VI

CRIB: Centro regional de investigaciones Biomédicas

CSC: célula madre cancerosa

CTD: dominio C- terminal

CTLA-4: antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos

DBD: dominio de unión de ADN

*DGIdb*: Base de Datos de Interacción Genética de Drogas

DMSO: dimetilsulfóxido

DOXO: doxorubicina

DTX: docetaxel

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor de crecimiento epidérmico

EMT: transición epitelio mesenquima

ET: dominio extraterminal	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
FAP: proteína de activación de fibroblastos	MC: Medio condicionado
FDA: <i>U.S Food and Drug Administration</i>	MSC: las madre mesenquimales
FGFR: eceptores del factor de crecimiento de fibroblastos	MT: Microambiente tumoral
GEICAM: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama.	mTOR: Diana mamífera de rapamicina
GSEA: Gene Set Enrichment Analysis	MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo
HER2: amplificación o sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2	NH2: dominio de aminoácidos
HR: Hazard Ratio	NIH: <i>National Institute Health</i>
iBET: inhibidores de BET	NRTK: TK no receptores
ICI: inhibidores de puntos de control inmunológicos	OMS: Organización mundial de la salud
IGF-2: factor de crecimiento similar a la insulina 2	P-TEFb: factor positivo de elongación
IGFR: receptores del factor de crecimiento similar a la insulina	PBS: tampón fosfato salino
iSRC: inhibidores de SRC	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
JAK: quinasa Janus	pCR: respuesta completa patológica
KM: Kaplan Meier	PD-1: inhibidores programados de la muerte celular 1
	PDGF-B: factor de crecimiento transformante B derivado de plaquetas
	PDGFR: receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas
	PI3K: fosfoinositida 3-quinasa

PPI: interacción proteína-proteína

PVDF: difluoruro de polivinilideno

RE: receptor de estrógenos

REDECAN: Red Española de Registros de  
Cáncer

RFS: supervivencia libre de recaída

RH: receptores hormonales

RNAPII: ARN Polimerasa II

RP: receptor de progesterona

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RTK: Receptores TK

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEOM: sociedad española de oncología  
médica

SFK: familia de quinasas de SRC

SH2: dominio de homología 2

SLE: supervivencia libre de enfermedad

STAT: transductor de señal y activador de  
la transcripción

STM: secretoma tumoral mamario

TAM: macrófagos asociado a tumores

TGF-beta: factor de crecimiento  
transformante  $\beta$

TIL: infocitos que infiltran los tumores

TK: proteínas tirosina quinasa

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

TS: esferas tumorales

VEGFR: receptor de crecimiento  
endotelial vascular

$\alpha$ SMA: actina del músculo liso alfa



# 1

## R E S U M E N

Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.

MARIE CURIE



# 1. Resumen

El cáncer de mama es la primera causa de muerte asociada a cáncer en mujeres a nivel mundial. A este respecto, varios factores están implicados en la iniciación y progresión de estos tumores. Los tumores del subtipo triple negativos (TNBC), los más agresivos, son muy heterogéneos y están enriquecidos en su microambiente tumoral (MT) de células madre cancerosas (CSC), que contribuyen a la progresión del cáncer. Además, estos tumores se caracterizan por la ausencia de receptores hormonales en su membrana, por lo que carecen de dianas específicas que puedan usarse para su tratamiento. La quimioterapia es la opción más utilizada, pero la aparición de resistencia a los fármacos debida, al menos en parte, a una comunicación bidireccional constante entre las células del tumor y su MT es un problema frecuente. Estas limitaciones terapéuticas hacen del TNBC el subtipo molecular con peor pronóstico. Explorar nuevas vías terapéuticas es una necesidad. Recientemente las proteínas de la familia de bromodominio y dominio extraterminal (BET) han emergido como potenciales dianas terapéuticas en TNBC.

Por ello, en la primera parte de esta tesis, describimos que el iBET JQ1 es capaz de alterar la transcripción de una firma de genes relacionados con la *stemness* y, por tanto, alterar las propiedades de las CSC presentes en el tumor. Además, el panel de genes identificado podría tener un papel clave no solo en la predicción de la respuesta del paciente a la quimioterapia y su pronóstico clínico, sino también en la prevención de la aparición de recidivas, comunes en TNBC.

Los resultados obtenidos en la segunda parte sugieren un papel relevante de la vía Src como mediadora en la interacción entre el nicho adiposo y la masa tumoral. La inhibición de esta ruta con dasatinib puede revertir el efecto protector proporcionado por el nicho adiposo del tumor, produciendo una disminución del potencial de tumorigénesis e invasión, una disminución del potencial de recurrencia y un aumento de la muerte celular producida por la apoptosis en las células TNBC *in vitro* e *in vivo*.

Nuestros resultados abren la puerta al desarrollo de nuevas estrategias dirigidas no sólo al tratamiento de tumores, sino también a las vías de señalización que regulan la MT para

tratar a los pacientes con cáncer de mama de forma más eficaz con el fin de revertir esta resistencia.



# 2

## I N T R O D U C C I Ó N

Un país sin investigación es un país  
sin desarrollo.

MARGARITA SALAS



## 2. Introducción

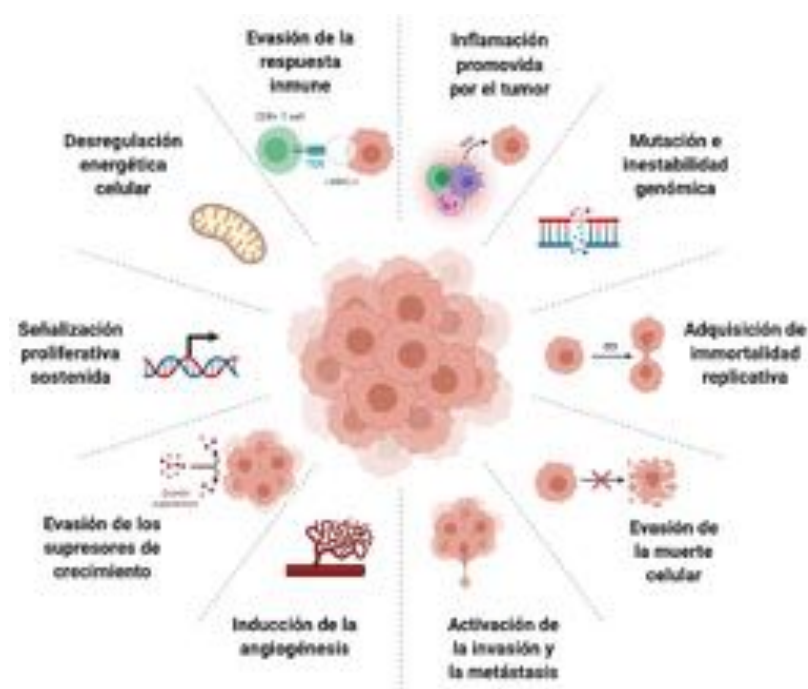
### 2.1. Cáncer

El término “cáncer” no define una sola enfermedad, sino que se emplea para englobar todas aquellas enfermedades que presentan células con una capacidad de proliferación, división y diseminación incontrolada en el mismo tejido u otro distinto al del lugar de origen. Asimismo, Hanahan & Weinberg en su primer artículo juntos, donde postularon los sellos identificativos del cáncer, añadieron a la definición anterior la capacidad de formación de nuevos vasos sanguíneos y de evasión de la muerte celular. Además, defendieron que estos cambios se producen como consecuencia de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas u otras alteraciones celulares que no pueden ser reparadas (Hanahan & Weinberg, 2000). De hecho, mientras que las células normales están sometidas a un control por el que tras determinado número de divisiones sufren una muerte programada, denominada apoptosis, las células tumorales tienen la capacidad de escapar a este control, creciendo de manera ilimitada y formando lo que conocemos como “tumores” o “neoplasias”, que pueden ser benignas o malignas. Si el tumor crece de manera lenta sin llegar extenderse de forma agresiva dentro de la cápsula fibrosa de origen que lo envuelve, simplemente imitando a las células normales del organismo, no se disemina ni infiltra en otros tejidos u órganos colindantes, será considerado como “benigno”. Sin embargo, se considerará maligno cuando la reproducción celular descontrolada y desordenada perjudica al organismo que lo posee. Si además de crecer rápidamente, logra trincar la lámina basal y destruir o invadir tejidos normales adyacentes será considerado como un tumor maligno infiltrante o invasivo (Talmadge & Fidler, 2010). Los tumores malignos pueden también diseminarse e invadir otras partes del cuerpo alejadas del tejido donde se ha producido el tumor primario. A este proceso lo conocemos como “metástasis” (Folkman, 2002).

El cáncer metastásico, independientemente del órgano al que se haya diseminado, se denomina con el mismo nombre y contiene células tumorales iguales al tumor primario.

Además, las metástasis no siempre ocurren a la vez que avanza el tumor primario, sino que puede darse como consecuencia de una recidiva, es decir, por la reaparición del tumor maligno tras un periodo de ausencia o latencia más o menos largo de la enfermedad. Asimismo, la gravedad de esta recidiva dependerá del tipo de tumor, del lugar de aparición, el tiempo de evolución y la extensión de este. No todos los tipos celulares presentan el mismo grado de “tumorigenicidad” o capacidad de iniciar tumores, es decir, no todos los tipos celulares poseen la misma capacidad de recidivar tras un tratamiento (Hanahan & Weinberg, 2000).

Posteriormente, ambos autores redactaron un segundo artículo donde actualizaron y añadieron nuevas características y capacidades de las células tumorales. Así, a las seis propiedades antes mencionadas se añadieron otras cuatro: la evasión del sistema inmune,



**Figura 1: Las características del cáncer.** Podemos emplear la definición de cáncer cuando una masa celular adquiere las siguientes 10 características: evasión de la apoptosis, desregulación energética, señalización proliferativa sostenida, evasión de antiproliferativos, evasión de la respuesta inmune, adquisición de inmortalidad replicativa, activación de la invasión y la metástasis, producción de inflamación en las zonas circundantes, inducción de la angiogénesis y acumulación de mutaciones e inestabilidad genómica. Miriam Nuncia Cantarero, basada en (Hanahan & Weinberg, 2011).

la reprogramación del metabolismo energético, la inestabilidad genómica y la inflamación (*Figura 1*) (Hanahan & Weinberg, 2011).

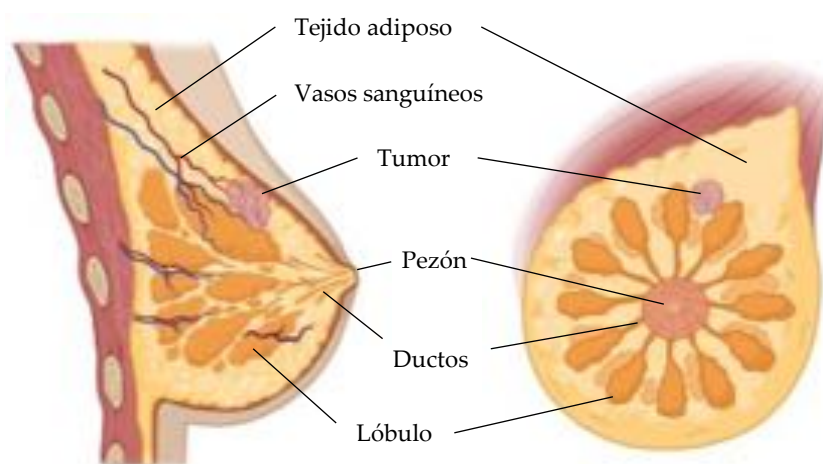
En todos los tumores, y en los de mama en concreto, se han estudiado la morfología, características y capacidades que presentan las células que componen el tumor y se ha observado que existen diferentes poblaciones celulares, lo que se conoce como heterogeneidad intratumoral (Campbell y Polyak, 2007; Marusyk y Polyak, 2010).

Este concepto contrasta marcadamente con la visión reduccionista anterior de los tumores como nada más que un conjunto de células cancerosas relativamente homogéneas, cuya biología completa podría entenderse aclarando las propiedades autónomas de estas células (Hanahan & Weinberg, 2011). Sin embargo, hoy en día sabemos que los tumores son diversos en la composición de las células que integran su microambiente tumoral (MT), la proporción de células estromales o estados de activación que las componen y los factores secretados por la mismas (Quail & Joyce, 2013). Por tanto, el estado fisiológico de su MT está estrechamente relacionado con la adquisición de las 10 capacidades anteriormente nombradas y desempeña un papel clave en la tumorigénesis, el desarrollo y la progresión del tumor (M. Wang et al., 2017).

## 2.2. Cáncer de mama

Atendiendo a la definición general establecida en el punto anterior, el cáncer de mama es la enfermedad producida por las células del tejido mamario que adquieren las 10 propiedades señaladas en la figura 1.

La mama es una glándula constituida por múltiples lóbulos y lobulillos unidos por una serie de tubos denominados ductos o conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón. Está irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos y, además, se encuentra rodeada de tejido graso, que le proporciona consistencia y volumen (*Figura 2*).



*Figura 2. Anatomía de la mama. Se muestra un tumor, los lóbulos y ductos, los vasos sanguíneos, el pezón y el tejido adiposo mamario.*

Según la zona de la mama donde se origine el tumor, podemos hablar de carcinoma lobulillar (si se forma en los lobulillos de la mama) o carcinoma ductal (si se forma en los ductos o conductos galactóforos). Por otro lado, dependiendo del grado de invasividad, se pueden clasificar como *"in situ"*, si no han roto la membrana basal de la glándula mamaria y, por lo tanto, pueden eliminarse simplemente con cirugía, o invasivos/infiltrantes, si han roto la lámina basal e invaden tejidos adyacentes. A su vez,

estos últimos pueden denominarse como metastásicos si invaden otros órganos, tanto por vía linfática como hematológica, y, por tanto, requieren de tratamientos más complejos para su eliminación, llegando, en ocasiones, a ser imposible su eliminación. Las localizaciones más frecuentemente afectadas en el cáncer de mama metastásico son los ganglios linfáticos de la axila y sitios distantes como el pulmón, el hígado, los huesos y el cerebro (Figura 3) (Cowell et al., 2013; Feng et al., 2018).

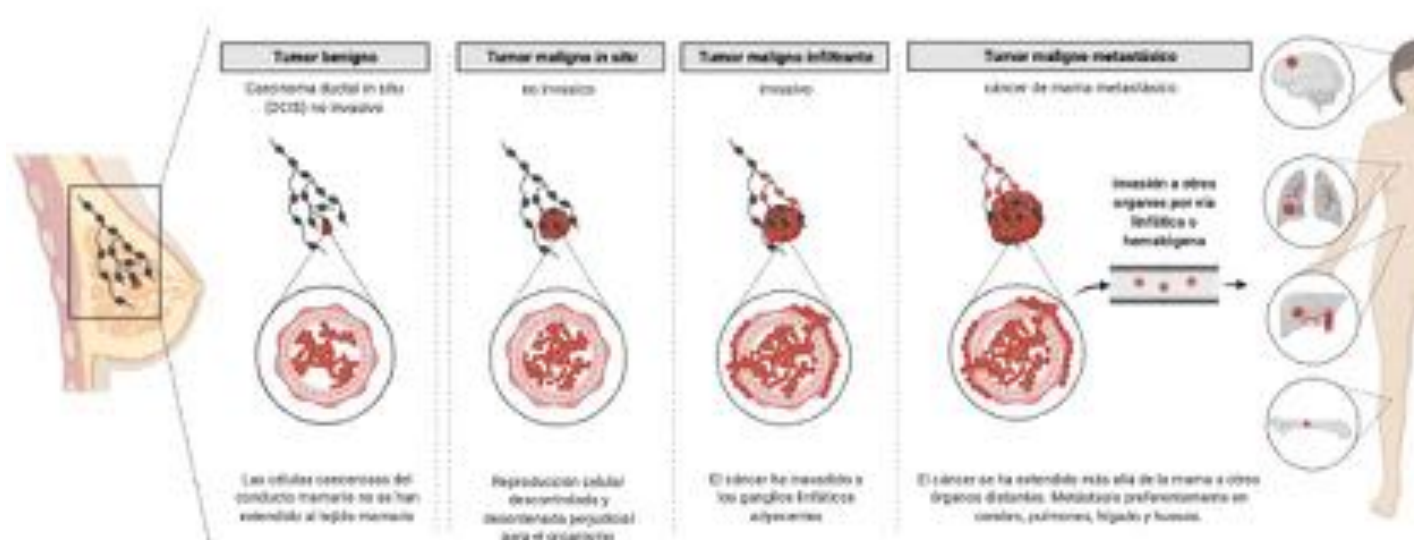


Figura 3: Tipos tumorales según su grado de malignidad. Tumor benigno y maligno (in situ, infiltrante o metastásico). Creada por Miriam Nuncia Cantarero

### 2.2.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor más frecuente entre mujeres en todo el mundo, con una incidencia de 132 casos por cada 100.000 habitantes, lo que constituye un total de 24,5% del total de casos de cáncer, según los últimos datos contenidos en el observatorio global del cáncer de la Organización mundial de la salud (OMS) (Cancer Today, s. f.). Aunque en menor medida, también puede afectar a los hombres, constituyendo menos de un 1% de todos los casos diagnosticados (Giordano et al., 2002). En el caso concreto de nuestro país, la asociación española contra el cáncer (AECC) estima que 1 de cada 8 mujeres españolas tendrá cáncer de mama en algún momento de su vida. De hecho, a pesar de que la

mortalidad causada por este tipo de tumor ha descendido drásticamente en los últimos años, en parte gracias a la detección precoz y la mejora en los tratamientos, el cáncer de mama continúa siendo con diferencia la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres. Según la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en 2021 habrá una incidencia de cáncer de mama en mujeres de 33.375 nuevos casos respecto a los 117.372 casos totales, cifra muy parecida y ligeramente al alza respecto al año 2020 (32.953) (Figura 4). Por otro lado, debido a la crisis mundial causada por la pandemia de la COVID-19, se estima que durante la primera ola se dejaron de diagnosticar 1 de cada 5 casos de cáncer en España, provocando una caída en los diagnósticos tempranos durante el año 2020, según indica la sociedad española de oncología médica (SEOM). Este hecho ha ocurrido a nivel mundial, sobre todo por la interrupción de los programas de cribado («Incidencia del cáncer de mama | GEICAM - Investigación cáncer de mama», s. f.). Este diagnóstico tardío unido al retraso en las cirugías oncológicas podría conllevar un aumento en la mortalidad por cáncer en los próximos años («Elective surgery cancellations due to the COVID-19 pandemic», 2020; Hanna et al., 2020).

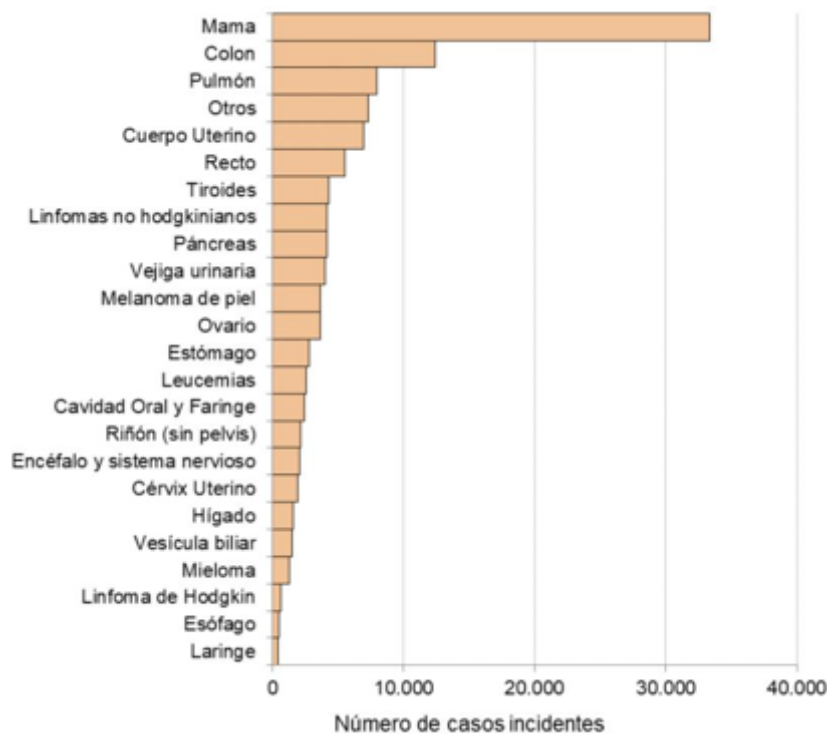


Figura 4: Número estimado de casos incidentes de cáncer en España por tipo tumoral en mujeres en el año 2021. Fuente: REDECAN



El 90% de los tumores mamarios son esporádicos, por lo que únicamente el 10% de los casos de cáncer de mama se atribuyen a mutaciones genéticas heredables y se manifiestan, al contrario que los esporádicos, en edades tempranas (mujeres premenopáusicas). Aunque varios factores genéticos contribuyen a la incidencia del cáncer de mama, el 40% de los casos hereditarios se deben a la mutación en los genes de alta penetrancia *BRCA1* y/o *BRCA2* que, heredados a través de forma autosómica dominante, predisponen genéticamente a padecer cáncer de mama (Momenimovahed & Salehiniya, 2019). Por otro lado, los cánceres esporádicos son producidos por alteraciones que no presentan un componente genético reconocible. Numerosos estudios han demostrado además que el riesgo de padecer cáncer de mama está condicionado por un amplio abanico de factores que también pueden afectar a la genética, siendo la edad, después del sexo, uno de los principales. El cúmulo de mutaciones genéticas espontáneas producidas a lo largo de la vida, necesario para que se desarrolle este tipo de cáncer, hace que sea más frecuente en edades tardías, entre los 55 y 64 años (Mao et al., 2013; Rojas & Stuckey, 2016).

Desde el nacimiento hasta la edad adulta reproductiva, los senos en las mujeres padecen múltiples cambios influenciados por las hormonas femeninas, estrógenos y progesterona. Finalmente, en la menopausia, los niveles hormonales descienden y gran parte de la glándula mamaria se atrofia y es sustituida por grasa, lo que también contribuye al aumento de los casos de cáncer de mama. Esto se puede ver agravado por un aumento de peso durante esta etapa y la inflamación que esto conlleva en el tejido adiposo (Simone et al., 2016; Zimta et al., 2019). Además de la edad y la obesidad, otros factores, como el inicio temprano de la menstruación, embarazos tardíos o ningún embarazo, la densidad de la mama, los tratamientos hormonales, el consumo de alcohol, la alimentación y la inactividad física pueden aumentar las probabilidades de sufrir cáncer de mama (Rojas & Stuckey, 2016; Coughlin, 2019).

### 2.2.2. Clasificación del cáncer de mama: el cáncer de mama triple negativo (TNBC)

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea, tanto desde el punto de vista histológico como molecular. Gracias al avance de las técnicas inmunohistoquímicas y de análisis genómico, se ha clasificado el cáncer de mama en distintos subtipos basándose en el perfil de expresión génica, principalmente la presencia o ausencia de expresión de los receptores hormonales (RH), receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP), y la amplificación o sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), entre otros marcadores inmunohistoquímicos (Arrechea Irigoyen et al., 2011).

Actualmente, se pueden distinguir cuatro subtipos moleculares en cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo (*Figura 5*). Cada uno de ellos presenta unas características histológicas y moleculares diferentes asociadas con las variaciones en la respuesta al tratamiento. Además, a cada uno de estos subtipos se les puede asignar un grado, 1, 2 o 3, en función del grado de diferenciación/desdiferenciación de las células tumorales en comparación a las células epiteliales mamarias normales y sus patrones de crecimiento. Esto es necesario para ayudar a predecir el pronóstico de la enfermedad y decidir qué tratamiento podría ser más eficaz para el paciente (Rakha et al., 2010).

- Grado 1 o bien diferenciado. Células tumorales que se asemejan más a las células del tejido mamario normal y de crecimiento más lento. Normalmente son RE+ y no es necesario una terapia muy agresiva. Con un seguimiento a largo plazo con o sin terapia hormonal sistémica es suficiente.
- Grado 2 o moderadamente diferenciado. Células tumorales que presentan diferencias claras con las células normales sin llegar a estar desdiferenciadas y cuya velocidad de crecimiento es un poco más rápido.
- Grado 3 o pobremente diferenciado. Existe una clara diferencia entre las células tumorales y las normales. Las células tumorales de grado 3, crecerán más rápido y se propagarán más rápido, por lo que necesitan un tratamiento sistémico más agresivo (quimioterapia).

Su conocimiento ayuda en la planificación de un tratamiento dirigido según las características del tumor, aunque la respuesta de cada paciente sigue siendo variable. Por esta razón, existe una clara necesidad de mejorar la comprensión de los marcadores pronósticos y predictivos que facilitarán el tratamiento personalizado. (Rivenbark et al., 2013b; Feng et al., 2018).

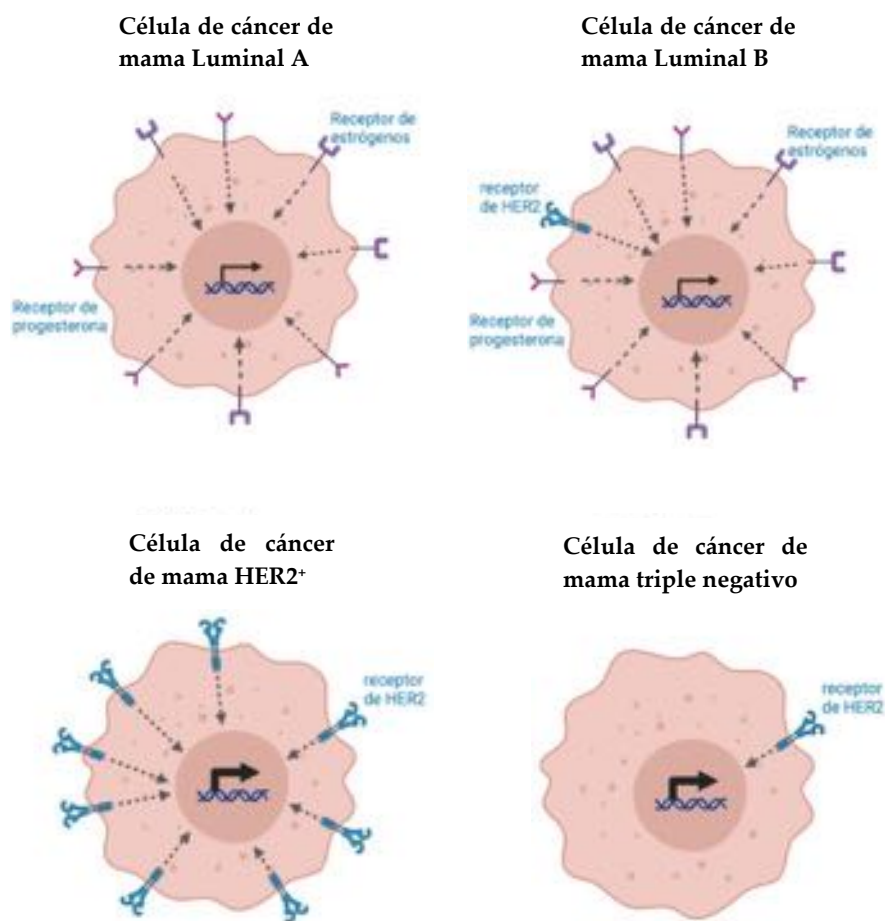


Figura 5: Células de cáncer de mama de los 4 subtipos moleculares. Creada por Miriam Nuncia Cantarero.

### 2.2.2.1. Luminal A

Es el subtipo más común, con una frecuencia de aproximadamente el 28-31% (Rivenbark et al., 2013b). Se caracteriza por expresar niveles altos de RE y/o RP ( $\geq 20\%$ ) y por la ausencia o bajos niveles de HER2. Además, presentan una alta expresión de genes relacionados con el RE y baja expresión de genes relacionados con la proliferación, como Ki-67. Normalmente son de bajo grado, y están asociados a buen pronóstico y mayor supervivencia a largo plazo. Sin embargo, las pacientes posmenopáusicas obesas portadoras de tumores RE+ presentan un factor de riesgo mayor que las pacientes con normopeso, por lo que la obesidad juega un papel importante en este subtipo y se asocia a peor pronóstico (Nuncia-Cantarero et al., 2018).

El tratamiento para estos tumores consiste en terapia hormonal (p. ej. Tamoxifeno), orientada a bloquear a los RH, y los pacientes responden bien a esta en la mayoría de los casos (Rivenbark et al., 2013b; Fragomeni et al., 2018; Provenzano et al., 2018).

### 2.2.2.2. Luminal B

Al igual que los anteriores, los tumores que pertenecen a este subtipo expresan alguno de los RH, ER o PR, pero además deben cumplir uno de estos dos requisitos: sobreexpresión de HER2 o una expresión superior al 14% del gen marcador de división celular nuclear Ki-67 (Cheang et al., 2009; Provenzano et al., 2018). Este subtipo molecular constituye el 20% de los cánceres de mama diagnosticados y presenta un peor pronóstico que el subtipo Luminal A, llegando incluso a mostrar recaídas en los 5 primeros años post-tratamiento. No obstante, al igual que Luminal A, el paciente presenta una buena supervivencia a largo plazo y se puede tratar con una terapia anti-hormonal, aunque en este caso responden peor y necesitan una combinación con quimioterapia debido a su mayor tasa de proliferación (Rivenbark et al., 2013b; Ades et al., 2014; Provenzano et al., 2018).

### 2.2.2.3. HER 2+

Este subtipo está presente en el 17% de los casos diagnosticados de cáncer de mama y se caracteriza por la sobreexpresión de HER2, tanto a nivel génico como de proteína, y por no expresar los RH (RE-/RP-). Además, el índice de proliferación, medido a través de Ki-67, es más alto que en los subtipos anteriores y un gran porcentaje de estos tumores tienen mutaciones en p53. Aunque muestran una buena respuesta a combinaciones de fármacos dirigidos (cerca del 50% responde al tratamiento con el anticuerpo monoclonal contra HER2, Trastuzumab) y quimioterapia citotóxica o T-DM1 (Trastuzumab conjugado con emtansina), el pronóstico de estos pacientes es malo (Figueroa-Magalhães et al., 2014; Rivenbark et al., 2013b).

### 2.2.2.4. TNBC

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) se caracteriza por la baja expresión o ausencia de RH (RE-/RP-) y la falta de amplificación de HER2. Estos tumores representan aproximadamente el 15% de todos los cánceres de mama y afectan sobre todo a mujeres jóvenes (menos de 50 años) (Badve et al., 2011; Bahman et al., 2021; Sharma, 2016).

Los TNBC a menudo presentan una sobreexpresión de proteínas y receptores que se encuentran normalmente en células basales o mioepiteliales de la mama normal, como citoqueratinas (CK) características de la capa basal (CK5/6, CK14 y CK17), y de genes relacionados con la proliferación celular, como el receptor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y el receptor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFR*), y suelen presentar mutaciones en p53 (Abramson et al., 2015; Lehmann et al., 2015). Además, el 75% de los tumores de carácter hereditario con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* suelen ser TNBC, siendo casi el 20% de los TNBC mutantes para *BRCA* (Foulkes et al., 2010; He et al., 2018; Pareja et al., 2016). A pesar de su alta sensibilidad inicial a la quimioterapia, los tumores presentan el comportamiento más agresivo de entre todos los subtipos y los pacientes presentan el peor pronóstico, ya que estos tumores tienen un alto grado de recurrencia y alta probabilidad de metástasis tras tres años del diagnóstico. Además, suelen acabar desarrollando resistencia a la quimioterapia. Las metástasis suelen darse en pulmones,

hígado, huesos e incluso en cerebro (Abramson et al., 2015; Feng et al., 2018; Lehmann et al., 2015; Tahara et al., 2019).

Por este motivo, en esta tesis doctoral pretendemos investigar nuevas posibilidades terapéuticas para tratar los TNBC con terapias más dirigidas y efectivas.

### 2.2.3. Abordaje terapéutico del cáncer de mama triple negativo: quimioterapia.

A pesar de que hoy en día se emplea un abordaje multidisciplinar para intentar combatir el cáncer (cirugía, radioterapia, quimioterapia simple, quimioterapia combinada...etc.), hay que tener en cuenta que todos los tumores no pueden ser tratados de la misma forma. La baja expresión o ausencia de los tres receptores en el subtipo TNBC (RE-/RP-/HER2-) hace que estos tumores carezcan de una diana terapéutica específica, no pudiendo responder a tratamientos dirigidos contra receptores hormonales (tamoxifeno o fulvestrant) o contra HER2 (trastuzumab), ya que no expresan estos marcadores, limitando las opciones de tratamiento posibles a la cirugía, radioterapia o la quimioterapia tanto de forma única como combinada.

En la actualidad, la quimioterapia sigue siendo la primera opción terapéutica para abordar el TNBC, pero aunque el mayor porcentaje de paciente que responden a la quimioterapia lo encontramos en este subtipo tumoral, las tasas de recidiva y metástasis también son más altas en el TNBC que en el resto de los subtipos de cáncer de mama, debido en gran parte a su alto potencial invasivo y tumorigénico (Deepak et al., 2020; Jhan & Andrechek, 2017). La mayoría de los compuestos quimioterápicos empleados actualmente para tratar TNBC actúan sobre vías de supervivencia celular, replicación y conservación del material genético, siendo las antraciclinas y los taxanos, en primera línea, y los platinos, en segunda línea, los más empleados, ya sean utilizados en monoterapia o en combinación. En los casos de cáncer metastásico, los pacientes tienen una media de supervivencia de unos 26 meses y una duración de la respuesta al tratamiento muy corta (Thomas et al., 2016).

### 2.2.3.1. Sales de platino

Las sales de platino (p. Ej., carboplatino, cisplatino y oxaliplatino) son compuestos que se utilizan como tratamiento en varios tipos de cáncer, incluido el TNBC, desde hace décadas. Las células cancerosas presentan un sistema de reparación del ADN defectuoso y esto hace que aumente la eficacia de los agentes que dañan al ADN. De esta forma la citotoxicidad producida por el cisplatino y otros agentes de platino se ejerce a través de diferentes mecanismos celulares (Johnstone et al., 2016; Garutti et al., 2019).

El cisplatino, también llamado cis-diamminedichloroplatinum (II), abreviado a cis-DDP o CDDP y aprobado en 1971 para su uso como agente antitumoral, es un complejo inorgánico electroneutro formado por dos grupos cloruro y dos grupos amino que rodean a una molécula de platino. Este quimioterápico se dirige de forma eficaz contra células de división rápida, produciendo sobre ellas un efecto citotóxico. El CDDP se une al centro reactivo N7 en residuos de purina causando daño en el ADN de las células cancerosas, impidiendo la formación de la bifurcación de replicación, produciendo el bloqueo de la división celular y en consecuencia la muerte celular apoptótica por la señalización celular en las rutas PKC, JNK, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y AKT (Kim et al., 2020; Zhou et al., 2018).

El CDDP no solo se usa para combatir el cáncer de mama, sino que también es efectivo para el tratamiento contra el cáncer de próstata, testicular, ovárico, vesical, de cabeza y cuello, cervical, esofágico, pulmonar, de estómago, neuroblastoma, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, sarcomas, mieloma múltiple, melanoma y mesotelioma (Dasari & Tchounwou, 2014).

### 2.2.3.2. Antraciclina

Las antraciclina son de los fármacos más empleados como terapia antitumoral sistémica en pacientes con cáncer. Desde su introducción en la década de 1960, las antraciclina se han utilizado en el tratamiento de muchas enfermedades neoplásicas, entre ellas el TNBC. La primeras antraciclina que se identificaron, doxorubicina y daunorubicina, se aislaron de los pigmentos naturales producidos por la bacteria *Streptomyces spp* (Hortobágyi, 1997). Con el tiempo, la modificación de la estructura general del anillo de antraciclina dio como resultado a aproximadamente 2000 análogos con perfiles antitumorales y de tolerabilidad diferentes pero superpuestos (Edwardson et al., 2015; Hortobágyi, 1997).

La doxorubicina (DOXO), también conocida por el nombre de Adriamicina, es un quimioterápico de la familia de las antraciclina que produce la inhibición de la síntesis del ADN y ARN y de síntesis proteica. La DOXO se intercala entre los pares de bases del ADN impidiendo el desenrollamiento de las cadenas y por tanto su transcripción y replicación, produciendo un efecto citotóxico en la célula (Fornari et al., 1994; Hortobágyi, 1997).

A parte del cáncer de mama, la DOXO también se usa para el tratamiento de cáncer de vesícula, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de útero, algunos tipos de leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfomas, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, sarcomas, cáncer de estómago, cáncer de testículo (célula germinal), y cáncer de tiroides («Doxorubicin - Chemocare», s. f.).



### 2.2.3.3. Derivados del taxano

El taxano tiene como origen el extracto crudo de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*. Fue en 1963 cuando se identificó por primera vez su actividad citotóxica ante las células tumorales como inhibidores del funcionamiento del huso mitótico. Sin embargo, no fue hasta el 1971 cuando se identificó el componente activo de este extracto, el paclitaxel (Wani et al., 1971). Años más tarde se modificó la forma de síntesis de este compuesto, dando lugar a compuestos semisintéticos mejorados más eficientes y con una mayor solubilidad en agua.

El primero de ellos el docetaxel (DTX), aprobado en 1996 por la administración de drogas y alimentos de la EE. UU (FDA, del inglés "*U.S Food and Drug Administration*"), y empleado actualmente como estrategia terapéutica en el TNBC. Cuando el DTX se une al huso mitótico desestabiliza los microtúbulos impidiendo su equilibrio de polarización y despolarización en la división celular normal. Cuando no funciona correctamente el huso mitótico, la célula no se puede dividir de forma bipolar, la mitosis se detiene en metafase y se provoca la muerte celular en un subgrupo de la población detenida (Krens et al., 2013; Weaver, 2014).

A parte de su uso para el tratamiento de mama, el DTX está aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de estómago avanzado y cáncer de próstata metastásico (Krens et al., 2013).

Recientemente se siguen desarrollando nuevos compuestos derivados de taxano, siendo los más nuevos el cabazitaxel y el paclitaxel unido a albúmina (Joerger, 2016; Krens et al., 2013).

Como hemos mencionado al principio de este apartado, la quimioterapia es actualmente la única opción de tratamiento sistémico para TNBC, pero aún no se han establecido protocolos óptimos (Lebert et al., 2018). El abordaje más utilizado es dar quimioterapia

neoadyuvante (antes de la cirugía) para un TNBC localmente avanzado o inoperable con regímenes de antraciclinas o taxanos administrados secuencialmente, que mejoran la supervivencia libre de enfermedad (SLE) comparado con otros patrones de tratamiento (Stover et al., 2016; von Minckwitz et al., 2012). Sin embargo, la quimioterapia basada en compuestos de platino, como cis- o carboplatino, ha mostrado resultados prometedores en los entornos neoadyuvantes y metastásicos (Lebert et al., 2018), donde se ha concluido que la respuesta completa patológica (pCR) era mayor principalmente en casos de enfermedad avanzada, y en tumores con *BRCA1* mutado (Lebert et al., 2018; Park et al., 2018). Sin embargo, hoy en día la adición de platinos a la terapia neoadyuvante aún no se ha considerado un tratamiento estándar, debido a que produce un aumento de la toxicidad. Además no se ha comprobado que el aumento de la pCR esté relacionado con una menor recurrencia (Andreopoulou et al., 2015; Bergin & Loi, 2019).

La Sociedad Europea Oncológica Médica (SEOM) no recomienda la administración tras la cirugía de quimioterapia adyuvante en casos donde la pCR no sea completa. Sin embargo, en los pacientes que presentan una alta probabilidad de recidivas se ha observado como la adición de agentes alquilantes al régimen anteriormente nombrado mejora la respuesta (Lebert et al., 2018; Park et al., 2018).

Aunque la quimioterapia continúa siendo el tratamiento por excelencia en el TNBC, en los últimos años se ha investigado si la radioterapia aumenta los beneficios en los pacientes. Generalmente, para todos los pacientes con un cáncer de mama invasivo y se les ha aplicado una mastectomía con un tumor de más de 5 cm o mastectomía con ganglios axilares positivos o cirugía conservadora de la mama se les recomienda la radioterapia. En concreto, se ha determinado que los pacientes con TNBC que han recibido radioterapia tienen menos riesgo de sufrir recidivas (Steward et al., 2014).

Por todo lo anteriormente expuesto, es esencial para mejorar el pronóstico, la supervivencia y las posibles recidivas de los pacientes de TNBC, la búsqueda de terapias específicas contra este tipo de tumor que nos permitan averiguar por qué se requiere administrar dosis tan elevadas que acaban produciendo toxicidad en el paciente.

#### 2.2.4. Nuevas terapias experimentales e inmunoterapia en TNBC

Debido a la naturaleza agresiva del TNBC y la falta de tratamientos dirigidos actuales, se buscan otras opciones de tratamiento sistémico más allá de la quimioterapia.

Con este fin, en los últimos años se están realizando estudios de expresión tanto de proteínas como genes que se encuentran sobreexpresados en pacientes con TNBC a diferencia de los otros subtipos de cáncer de mama o individuos sin la enfermedad pueden ser claves en el tratamiento del TNBC. Por ello, diseñar compuestos que comprometan la integridad de estas moléculas específicas, dianas terapéuticas, que se expresan de forma diferencial puede ser clave para diseñar nuevos tratamientos, más dirigidos y efectivos contra el TNBC.

La mayoría de los compuestos que están en ensayos clínicos se dirigen hacia proteínas diana implicadas en el ciclo celular (CDKs, CHK1 y WEE1), proteínas diana implicadas en el daño al ADN (como los inhibidores de PARP) y factores de crecimiento y angiogénesis (EGFR, VEGFR y FGFR), que están sobreexpresados particularmente en este tipo de tumor. Además, también se están estudiando compuestos aprobados por la FDA, para el tratamiento de otros tipos de cáncer, que presentan gran sensibilidad por dianas terapéuticas potenciales identificadas en el TNBC como SRC, el receptor de andrógenos y DNMT1. Todos los compuestos dirigidos contra estas dianas terapéuticas potenciales se están estudiando tanto solos como en combinación con quimioterapia y se encuentran en fase clínicas I, II y III (Jhan & Andrechek, 2017).

Además, ensayos clínicos publicados recientemente han demostrado que la inmunoterapia tiene un papel importante en el paradigma del tratamiento de esta devastadora enfermedad (Bergin & Loi, 2019). La inmunoterapia ha conseguido prolongar la supervivencia en otros tumores sólidos y representa por tanto una estrategia de tratamiento prometedora para el TNBC. Los agentes inmunoterapéuticos más exitosos consisten en inhibidores de puntos de control inmunológicos (ICI), que bloquean los receptores inmunosupresores, como el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y los inhibidores programados de la muerte celular 1 (PD-1), para mejorar la citotoxicidad

y la capacidad proliferativa de los linfocitos que infiltran los tumores (TIL). Los ICI, incluidos los anticuerpos monoclonales contra PD-1 (es decir, pembrolizumab, nivolumab), y el inhibidor del ligando 1 de la muerte celular programada PD-L1 (es decir, atezolizumab, durvalumab, avelumab) y CTLA-4 (es decir, ipilimumab), han generado respuestas duraderas en muchos tipos de tumores. Aunque la inmunoterapia con pembrolizumab como monoterapia tiene una tasa de respuesta global del 5% de los casos, combinado con quimioterapia con antraciclinas y taxanos como agente de inducción para mejorar la sensibilidad al bloqueo de PD-1 ha empujado el límite de la pCR aún más (Keenan & Tolaney, 2020).

#### 2.2.5. Limitaciones de los tratamientos actuales: Resistencia a los tratamientos

Como se ha explicado a lo largo de la introducción, a pesar de la buena respuesta inicial que tienen los pacientes de TNBC a quimioterapia, algunos son refractarios a estos compuestos. En cualquier caso, la gran mayoría acaban desarrollando resistencias a medida que avanza el tratamiento, lo que dificulta aún más su manejo y provoca que sean más invasivos y presenten un peor pronóstico.

Atendiendo a esto, la resistencia a fármacos puede darse de dos formas diferentes: de manera intrínseca o extrínseca. La resistencia intrínseca, o basal, es la que presenta el tumor "*de novo*", antes de un tratamiento, y determina su respuesta tras la primera exposición a un fármaco. En cambio, la resistencia extrínseca, o adquirida, se adquiere tras la exposición a la droga y repercute en la respuesta a exposiciones posteriores (O'Reilly et al., 2015). Aún teniendo claro las dos definiciones, clasificar el tipo de resistencia que presenta un tumor a los fármacos muchas veces es más complicado de lo que parece, siendo muy difusa la línea entre resistencia intrínseca y extrínseca y las causas que la originan debido a la enorme plasticidad celular que presentan las células tumorales al estar expuestas y en constante comunicación con su microambiente.

En consecuencia, en los últimos años, se han realizado enormes esfuerzos para dilucidar los mecanismos de la quimiorresistencia implicados en el TNBC con el objetivo de identificar nuevas dianas moleculares que puedan hacerle frente. Se ha hecho evidente que el desarrollo de la quimiorresistencia TNBC es multifactorial y se basa en la alteración de múltiples vías de señalización producidas como consecuencia de la compleja interacción existente entre el MT, el flujo de drogas, las células madre cancerosas y las células de la masa tumoral (Nedeljković & Damjanović, 2019).

### 2.2.5.1. Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca se define como la resistencia innata que existe *per se*, antes de que el paciente sea expuesto a un tratamiento, lo que generalmente causa una eficacia reducida del tratamiento farmacológico. La resistencia intrínseca puede ser causada por:

- Mutaciones genéticas preexistentes (inherentes). Dan como resultado una disminución de la capacidad de respuesta de las células cancerosas de TNBC tanto a la quimioterapia como a los medicamentos diana. Esto puede ser debido a la presencia de mutaciones en genes implicados en el crecimiento y / o apoptosis de las células cancerosas o mutaciones en enzimas encargadas de la reparación del daño al ADN como la topoisomerasa II (O'Reilly et al., 2015; X. Wang et al., 2019).
- La heterogeneidad genética y celular intratumoral en tumores primarios. Los pacientes responderían a la terapia inicialmente porque la mayoría de las células tumorales son sensibles al medicamento. Sin embargo, la gran diversidad poblacional celular existente en el tumor permitiría que los subclones resistentes preexistentes, incluidas las células madre del cáncer (CSC), proliferen después del tratamiento farmacológico, lo que conduciría a una recaída en las etapas posteriores del tratamiento terapéutico causando una recurrencia.
- Heterogeneidad del MT. El MT está formado por una gran diversidad de células y factores secretados por las mismas, muchas de estas células presentan gran plasticidad fenotípica que les permite la capacidad de cambiar bidireccionalmente

entre los estados epitelial y mesenquimal. Esta conversión se logra a través de la transición epitelio mesenquima (EMT), que es un proceso bidireccional y reversible. Por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSC). Dependiendo del balance puede que un paciente responda de forma diferente al tratamiento (Mehraj et al., 2021).

- Activación continua de vías intrínsecas utilizadas como defensa contra los medicamentos contra el cáncer. Activación mantenida de las vías NF- $\kappa$ B o fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)/AKT, activación de los transportadores ABC presentes en las CSC, la sobreexpresión de la subunidad III de la  $\beta$ -tubulina, el aumento de la inestabilidad genómica y la inactivación del fármaco por la sobreexpresión de *MYC*, la inactivación y detoxificación del fármaco por la sobreexpresión de *ALDH1/ALDH3* y finalmente el aumento de las glutatión y glutatión-S transferasas (Kumari et al., 2017; O'Reilly et al., 2015; X. Wang et al., 2019).

#### 2.2.5.2. Resistencia adquirida

Por otro lado, la heterogeneidad celular de los tumores también puede permitir al tumor adaptarse tras los tratamientos y generar resistencia a los tratamientos provocando el fracaso de las terapias (Wein & Loi, 2017). A sí pues, podemos identificar que estamos ante una resistencia adquirida cuando localizamos una reducción gradual de la eficacia anticancerígena de un fármaco después del tratamiento farmacológico (X. Wang et al., 2019). La resistencia adquirida puede ser el resultado de:

- Alteraciones genéticas. Como puede ser la activación del segundo protooncogén que se convierte en el gen impulsor recién surgido. Es decir, pueden surgir nuevas mutaciones genéticas que otorguen a las células de resistencia a la quimioterapia. De este modo, estas células serán las que prevalezcan y por tanto puedan permitir al tumor recidivar de nuevo.

- Mutaciones epigenéticas o mutaciones/alteraciones en los niveles de expresión de las dianas terapéuticas del fármaco. Lo que impide la unión del fármaco o disminuye su eficacia.
- Cambios en el MT después del tratamiento (X. Wang et al., 2019). Durante la progresión del cáncer existe una estrecha comunicación entre las células tumorales y su MT. El diálogo entre las células tumorales y las células no cancerosas que lo componen como adipocitos, células endoteliales, los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), MSC y TAM, entre otras, median, en gran medida la aparición de resistencias a quimioterapia (Magali Castells, Thibault, Delord, & Couderc, 2012). Esta comunicación puede llevarse a cabo de diversas formas:
  - Interacciones célula-célula y célula-matriz, que alteran los mecanismos de apoptosis de las células tumorales y, por lo tanto, afectan a la resistencia a fármacos (Muschler & Streuli, 2010).
  - La liberación local de factores solubles, tales como interleucina-6 (IL-6), que promueve la supervivencia y el crecimiento tumoral en respuesta a un tratamiento (Sullivan et al., 2009).
  - La interacción directa célula tumoral-célula del MT (X. Wang et al., 2019).
  - Formación de nichos específicos dentro del MT. Estos nichos protectores comprenden subpoblaciones de CSC, que presentan una mayor supervivencia tras la exposición inicial al fármaco. El nicho actúa sobre estas CSC, que presentan una sobreexpresión de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante B derivado de plaquetas (PDGF-B), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-beta), el factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo que ayuda a estas células a mantenerse y escapar de los mecanismos de muerte celular inducidos por quimioterapia (Majidinia & Yousefi, 2017).
  - La conversión, o desdiferenciación, de las células tumorales a CSC gracias a un aumento de la plasticidad celular (Majidinia & Yousefi, 2017).

Ambos mecanismos de resistencia pueden coexistir durante la progresión y el tratamiento del tumor. Uno de los objetivos del tratamiento farmacológico debería ser ralentizar o detener eficazmente el crecimiento tumoral sin inducir una resistencia farmacológica adquirida. Por tanto, el mejor plan de tratamiento farmacológico debería tener en cuenta la prevención o el retraso de la farmacorresistencia adquirida intentando esquivar a la intrínseca.



## 2.3. Microambiente tumoral (MT)

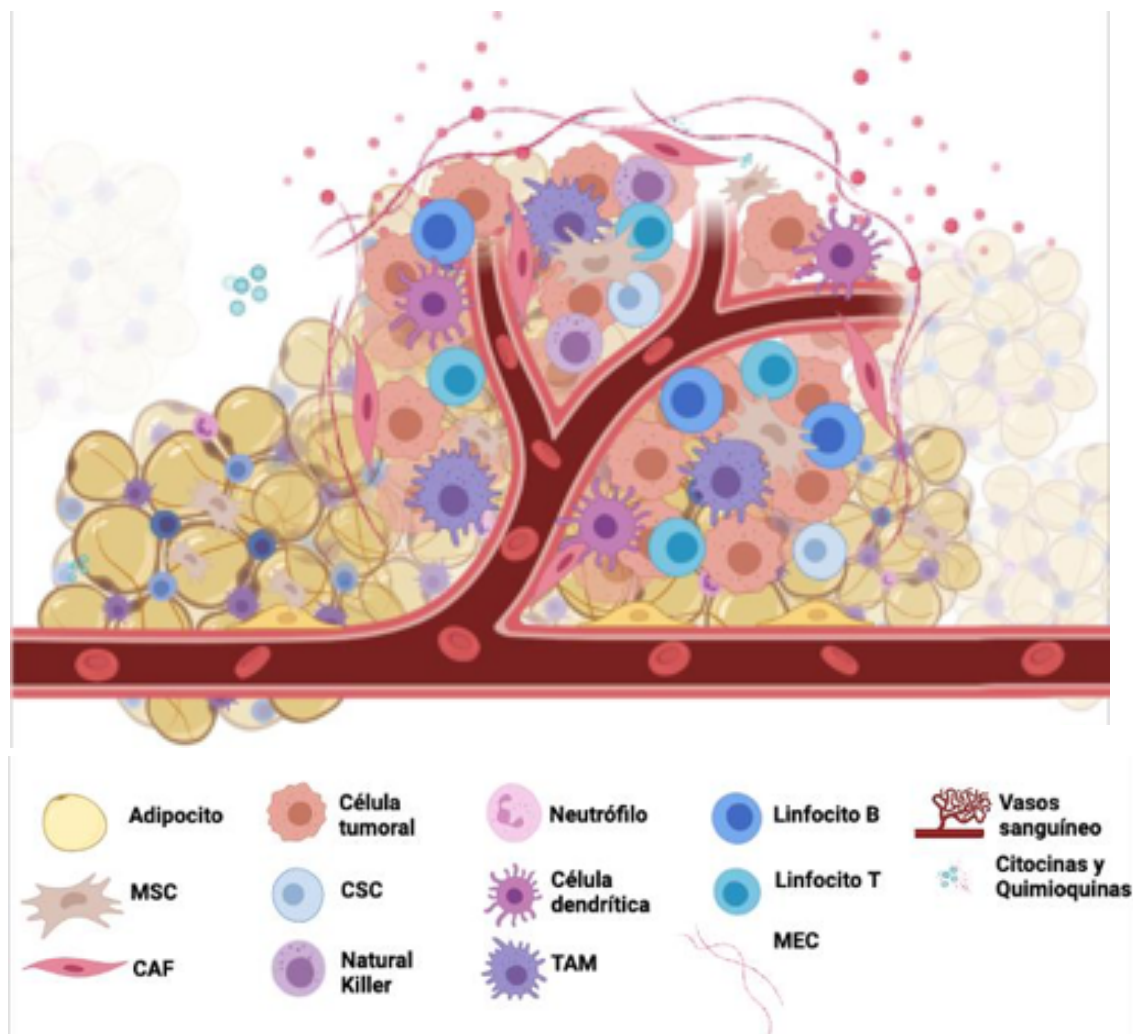
Como se ha mencionado previamente, durante las últimas décadas, la búsqueda de nuevos tratamientos eficaces contra el cáncer se ha abordado desde una perspectiva limitada de la enfermedad, centrándose en el estudio de las células tumorales e ignorando el resto de componentes que se encuentran interaccionando con el tumor de forma activa y que pueden, por tanto, condicionar su comportamiento (Hanahan & Weinberg, 2000). Sin embargo, en los últimos años esta tendencia está cambiando y se están empezando a considerar los tumores como estructuras dinámicas que requieren de la interacción con las células normales del ambiente que les rodea, denominado “nicho o microambiente tumoral” (MT).

En 1989 Paget postuló por primera vez la hipótesis de “la semilla y el suelo”. Esta hipótesis postula que es necesario un microambiente huésped apropiado (el suelo) para un crecimiento óptimo de las células tumorales (la semilla) (Langley & Fidler, 2011; Paget, 1989). Por tanto, podría entenderse que las células normales que rodean al tumor son reclutadas por este para constituir el estroma tumoral, siendo en consecuencia participantes activos en la tumorigénesis. Como tal, estas células estromales contribuyen al desarrollo y la expresión de ciertas capacidades fisiopatológicas distintivas. En los últimos años, esta noción ha ido tomando fuerza y ampliándose, revelando que la biología de los tumores ya no puede entenderse simplemente como las características de las células cancerosas, sino que debe abarcar los aportes del MT a la tumorigénesis y la progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 2.3.1. El MT en el cáncer de mama

El MT mamario lo componen dos compartimentos que interaccionan entre sí estrechamente, denominados parénquima y estroma (*Figura 6*). El parénquima contiene las células tumorales, tanto las normales como las CSC, mientras que el estroma está formado por material sólido no celular, como la matriz extracelular (MEC), que actúa

como soporte y protección, poblaciones celulares no tumorales, y todos los factores solubles secretados por las células y estructuras, que en su conjunto conforman el secretoma tumoral mamario (STM), como citoquinas, factores de crecimiento, microvesículas y enzimas proteolíticas (metaloproteinasa de matriz y el inhibidor tisular de metaloproteínas). Entre las células del estroma encontramos células no malignas maduras, como células inmunitarias infiltrantes (macrófagos asociados a tumores (TAM) y linfocitos), los CAF y los adipocitos, e inmaduras, como las células madre hematopoyéticas y las MSC (D'souza et al., 2013; Hanahan & Weinberg, 2011; Majidinia & Yousefi, 2017; Mao et al., 2013; Velaei et al., 2016).



**Figura 6. Esquema del microambiente tumoral de cáncer de mama.** En esta figura se representan los adipocitos, las células madre mesenquimales (MSC), los fibroblastos asociados a tumores, las células tumorales, las células madre tumorales (CSC), células natural killer, dendríticas, neutrófilos, macrófagos asociados a tumores, linfocitos B y T, matriz extracelular (MEC), vasos sanguíneos y citoquinas y quimioquinas. Creado por Miriam Nuncia Cantarero.

### 2.3.1.1. Parénquima tumoral: Células tumorales y CSC

Los tumores mamarios, al igual que otros tumores sólidos, se componen de diferentes poblaciones celulares que presentan diferente morfología, características y capacidades. Este concepto conocido como heterogeneidad intratumoral es debido, entre otros componentes del MT, a las CSC (Campbell & Polyak, 2007; Khera et al., 2021; Marusyk & Polyak, 2010). A diferencia de las células tumorales normales, que tienen una tasa muy alta de proliferación, pero un potencial de división limitado, las CSC se caracterizan por su capacidad de estar en un estado durmiente o de autorrenovación ilimitada dependiendo de los estímulos que reciban de su MT. Si la CSC recibe señales de rutas de señalización relacionadas con la activación del ciclo celular como los componentes de las vías Hedgehog Gli2 y Bmi-1 (Moore & Lyle, 2010), entre otros, promoverá un estado de autorrenovación. Por el contrario, si las CSC no reciben estas señales reguladoras y además son sometidas a radioterapia o quimioterapia podría promoverse un estado inactivo o durmiente, de baja proliferación celular. Las CSC que sobreviven tendrían la capacidad de reiniciar su ciclo celular y producir células progenitoras que se dividen rápidamente pudiendo restablecer el tumor debido ahora a su alta tasa de proliferación. Incluso es probable que ciclos sucesivos de quimioterapia promuevan tumores más agresivos, de mayor grado, al debilitar el conjunto normal de CSC y crear CSC resistentes a la terapia que dan lugar a otras CSC resistentes al tratamiento (Moore & Lyle, 2010; Najafi, Farhood, et al., 2019; Najafi, Mortezaee, et al., 2019). Además, las CSC presentan otros rasgos que las caracteriza, como su potencial de diferenciarse en cualquier tipo celular en el tumor debido a su plasticidad fenotípica, la resistencia a múltiples fármacos y la sobreexpresión de una batería de genes relacionados con las células madre, como *CD24*, *CD34*, *CD44*, *CD123*, *CD133*, *ABCG2*, *ALDH1*, *c-kit*, *EpCAM*, *Oct4*, *Nanog*, y *Sox2* (Najafi, Farhood, et al., 2019).

A su vez, las CSC tienen un papel muy importante en el inicio, desarrollo y progresión de los tumores *in vivo*, ya que un único clon de CSC es capaz de dividirse y regenerar un tumor a partir de una única célula aislada (Campbell & Polyak, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011; Martelotto et al., 2014). Del mismo modo, estas células tienen la capacidad

de generar clones *in vitro* y de regenerar un tumor después de su trasplante en animales inmunodeficientes (Najafi, Farhood, et al., 2019). Al mismo tiempo, las CSC portan las mutaciones oncogénicas y supresoras de tumores que definen al cáncer como una enfermedad genética (Campbell & Polyak, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011; Martelotto et al., 2014).

Las CSC, por tanto, pueden representar una doble amenaza para el tratamiento del cáncer, son más resistentes a la destrucción terapéutica y, al mismo tiempo, están dotadas de la capacidad de regenerar un tumor una vez que se ha detenido la terapia, aumentando por tanto su malignidad. Al conjunto de todas estas propiedades características de las CSC las englobamos dentro del término *stemness* (Khera et al., 2021; Serrano-Oviedo et al., 2020).

#### 2.3.1.2. Estroma tumoral: Tejido adiposo

El tejido adiposo es el componente más abundante que rodea a las células de cáncer de mama en el estroma tumoral (Mao et al., 2013). A su vez, presenta función de sostén, ya que en él se encuentran embebidas las otras células del estroma que componen el MT y permite que interaccionen unas con otras, entre ellas, células maduras, como adipocitos, células del sistema inmune/inflamatorias, células endoteliales, CAF, y células inmaduras, como las MSC. Además, contiene todos los factores secretados por las células que lo componen.

Existen evidencias de que el tejido adiposo asociado al tumor (CAAT) es un componente clave de la progresión del cáncer de mama y de la carcinogénesis. Se ha demostrado que el colágeno VI (COLVI) se expresa abundantemente en el CAAT y está implicado en la progresión del tumor mamario *in vivo* (Iyengar et al., 2003, 2005). Además, hay pruebas de que el CAAT promueve el crecimiento y la supervivencia de las células del cáncer de mama, así como sus capacidades migratorias e invasivas *in vitro* e *in vivo* mediante la secreción de citoquinas (IL-6, IL8, CCL-5 y CXCL12/SDF-1), la expansión de las CSC, la inducción de la EMT en las células tumorales y contribuyen a la radioresistencia, al igual

que las CAF, en el cáncer de mama (Bochet et al., 2011; Mao et al., 2013). Hecho que hace pensar que el CAAT también puede estar implicado en la quimiorresistencia en los pacientes con TNBC.

#### 2.3.1.2.1. *Adipocitos*

Los adipocitos son células endocrinas activas capaces almacenar energía y de regular rutas de señalización mediante la secreción de factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, conocidas como adipoquinas (Atiya et al., 2020; Castells et al., 2012). Los adipocitos asociados al cáncer presentan un fenotipo modificado por el tumor y al mismo tiempo son capaces de causar una modificación en el fenotipo de las células tumorales. Dicha interacción favorece la proliferación y metástasis del cáncer de mama al mismo tiempo que contribuye a la remodelación de la matriz extracelular, la invasión, y resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia (Atiya et al., 2020; Bochet et al., 2011; Dirat et al., 2011; Majidinia & Yousefi, 2017).

Los adipocitos secretan IL-6 que activa la proteína Chk1 en las células de cáncer de mama, produciendo una mayor resistencia a la quimio- y radioterapia (Nieto-Jimenez et al., 2020). Además, los factores secretados por los adipocitos mejoran la resistencia de las células de cáncer de mama a la privación de suero mediante la activación de un programa pro-supervivencia. Se ha visto que la interacción por contacto adipocito-células tumorales en leucemia activa la transcripción de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Pim-2), que aumentan la resistencia a la quimioterapia (Bochet et al., 2011; Castells et al., 2012).

#### 2.3.1.2.2. *Células del sistema inmune/inflamatorias*

La interacción entre las células cancerosas y su microambiente es una parte fundamental del desarrollo y la progresión del tumor. La capacidad de los tumores para evadir el sistema inmunológico se describe como un proceso de tres fases (eliminación, equilibrio y escape) que comúnmente se denomina inmunoedición del cáncer (Pardoll, 2012). Se cree que todos los cánceres pasan por el proceso de inmunoedición y solo se vuelven clínicamente detectables en la fase de escape.

Aunque el cáncer de mama no se considera un cáncer altamente inmunogénico, el MT del cáncer de mama es rico en infiltrados inmunes con funciones distintas (Burugu et al., 2017). Dentro del MT podemos encontrar una gran cantidad de células inmunes/inflamatorias como los macrófagos, células T, células asesinas naturales (NK), células dendríticas y células B. Además, estos componentes varían en número, composición y distribución según los diferentes tipos/subtipos de cáncer (Burugu et al., 2017; Majidinia & Yousefi, 2017).

Debido a su naturaleza multifuncional, los TAM, son de suma importancia en la patogénesis del TNBC. Al activarse, los TAM, con fenotipo inmunosupresor (M2), atraídos por las citoquinas polarizantes M2 (IL-4, IL-10, IL-13) liberadas por el MT, actúan como agentes quimioatrayentes hacia el tumor. Una vez asociados a los tumores influyen en diversos procesos como la presentación de antígenos, la angiogénesis tras secretar VEGF, la atracción de monocitos tras secretar el factor-1 estimulante de colonias (CDF1), la mutagénesis de células tumorales, la degradación de la matriz y la resistencia a los medicamentos.

Por otra parte, varios estudios han indicado una correlación positiva entre el aumento del número de macrófagos infiltrados en los tumores de mama y los conocidos signos de mal pronóstico, incluyendo una alta actividad mitótica y grado del tumor, así como un bajo estado de los RE y RP (Laoui et al., 2011; Majidinia & Yousefi, 2017).

#### 2.3.1.2.3. *Células endoteliales*

Las células endoteliales interactúan directamente con las células tumorales y generan nuevos vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos son una parte esencial del MT, transportan los nutrientes y el oxígeno necesario para la supervivencia y el crecimiento del tumor (Castells et al., 2012; D'souza et al., 2013).

Durante el proceso de angiogénesis tanto las células tumorales como las endoteliales secretan VEGF al MT. El VEGF no sólo es un mitógeno sino también es un factor de supervivencia; su sobreexpresión puede activar la vía de supervivencia PI3K/AKT, inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas, destacando la survivina y Bcl-2, y además inducir resistencia a los fármacos quimioterapéuticos.

En el proceso de angiogénesis las células endoteliales también secretan FGF-2, un factor angiogénico que actúa de modo similar a VEGF (Castells et al., 2012).

#### 2.3.1.2.4. *Fibroblastos asociados a tumores (CAF)*

Los CAF son uno de los subtipos más abundantes del MT. Aunque no se sabe con certeza su origen o cómo caracterizar su fenotipo, una cosa está clara: intervienen en el proceso de inducción de tumores y se diferencian de los fibroblastos normales por la expresión de algunos marcadores como actina del músculo liso alfa ( $\alpha$ SMA), proteína de activación de fibroblastos (FAP), tenascina-C o desmina.

Los CAFs pueden regular la composición de la matriz extracelular mediante la secreción de periostina, un ligando de integrinas  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$ , que permite la adhesión y migración de las células tumorales, y al mismo tiempo regular la resistencia a la apoptosis mediante la activación de PI3K-AKT/PKB en modelos de cáncer de mama (Castells et al., 2012; Ruan et al., 2009).

### 2.3.1.2.5. Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC son progenitores adultos multipotentes no hematopoyéticos con una morfología similar a la de los fibroblastos, capaces de diferenciarse en linajes adipocíticos, osteogénicos, condrogénicos y miogénicos (D'souza et al., 2013). Aunque su morfología es distinta a la de sus estados diferenciados, podemos diferenciar a las MSC de otros tipos celulares cuando cumplan los siguientes criterios mínimos (Dominici et al., 2006):

1. Deben crecer adheridas a la placa de cultivo tras un cultivo de explante de grasa.
2. Deben expresar los marcadores celulares  $CD105^+$ ,  $CD73^+$  y  $CD90^+$  y no expresar  $CD45^-$ ,  $CD34^-$ ,  $CD14^-$  o  $CD11b^-$ ,  $CD79\alpha^-$ ,  $CD19^-$  y  $HLA-DR^-$ .
3. Deben poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*.

Aunque podemos aislar MSC de diferentes tejidos: ovario, cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón, músculo, timo, páncreas, cordón umbilical...etc., donde las podemos encontrar en mayor cantidad es en el tejido adiposo y en la médula ósea (Atiya et al., 2020; D'souza et al., 2013).

Por otro lado, dentro del MT, los factores secretados por el tumor y las interacciones directas de las células tumorales con las MSC inducen un fenotipo pro-tumorigénico en la población de MSC, creando células madre mesenquimales asociadas al carcinoma (CA-MSC) diferentes de las MSC normales. Las CA-MSC conservan su capacidad de diferenciación y sus marcadores de superficie estromal, pero contribuyen a la progresión del tumor a través de varios mecanismos (Atiya et al., 2020):

1. La diferenciación en otros linajes celulares protumorigénicos del MT, como los CAF, en presencia de las células tumorales.
2. La supresión de la respuesta inmunológica. Las MSC presentan quimiotaxis hacia las quimiocinas inflamatorias que liberan los tejidos dañados, migran a la herida y suprimen la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (M. Wang et al., 2018).



3. La inducción de la angiogénesis. Las CA-MSC secretan una serie de factores pro-angiogénicos solubles, como LIF, M-CSF, MIP-2, VEGF, IFN- $\gamma$ , y TNF $\alpha$  que inducen la neovascularización del tumor. Además, inducen la activación de las vías de señalización ERK1/2 y p38 MAPK, que aumentan la expresión de VEGF y CXCR4 en las células (Zhu et al., 2012).
4. Promueve la EMT.
5. Favorece el estado de CSC, por ejemplo, a través de la vía NF- $\kappa$ B mediante la secreción de CXCL12, IL-6, y IL-8 (Plaks et al., 2015).
6. El aumento de la supervivencia de las células tumorales.
7. Inducen la metástasis tumoral. Las MSC secretan al MT TGF $\beta$ . Este factor está implicado en el aumento del potencial de migración e invasión. Además, también aumentan la expresión de genes diana de la ruta de señalización WNT (Axin2, Dkk1, y  $\beta$ -catenina).

## 2.4. Papel de la epigenética en Cáncer

La epigenética se define como el estudio de las alteraciones estables y heredables (pero reversibles) en la expresión génica que ocurren sin alteración de la secuencia de los nucleótidos del ADN (Cheng et al., 2019). Las desregulaciones epigenéticas frecuentemente están relacionadas con enfermedades humanas, en particular el cáncer.

El inicio y la progresión del cáncer, aunque más particularmente el mantenimiento y supervivencia de las CSCs (Toh et al., 2017), no solamente es resultado de una mutación genética, sino también de una regulación epigenética aberrante como la metilación del ADN, la posición de los nucleosomas, la regulación post-traducciona por ARNs no codificantes y las modificaciones en las histonas (Kanwal et al., 2015; Zhao et al., 2018).

Los elementos principales que participan en las vías o modificaciones epigenéticas los podemos dividir en tres categorías: escritores, borradores y lectores. Los escritores epigenéticos son enzimas que transfieren grupos químicos al ADN o las histonas; los borradores epigenéticos los que los eliminan; y los lectores epigenéticos son las proteínas que reconocen las modificaciones en el ADN o las histonas (Cheng et al., 2019).

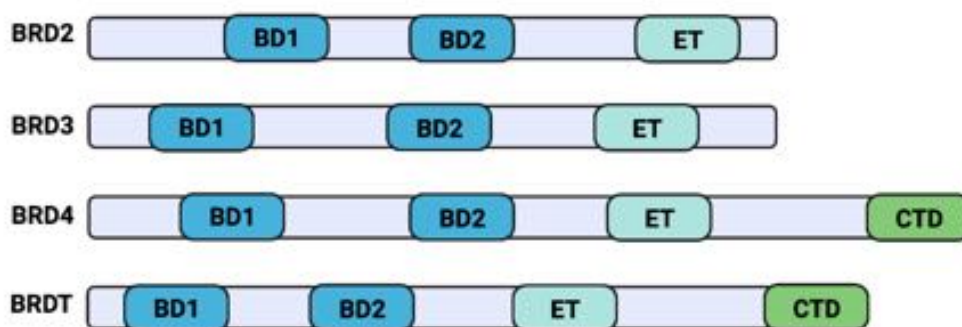
En las últimas décadas, se ha avanzado mucho en la investigación de medicamentos epigenéticos y se han desarrollado una variedad de compuestos dirigidos a proteínas reguladores epigenéticos que se encuentran en ensayos clínicos, como los inhibidores de las metiltransferasas de ADN, las histonas desacetilasas, las histonas metiltransferasas, las demetilinas específicas de lisina y las proteínas de la familia de bromodominio y dominio extraterminal (BET) (Zhao et al., 2018).

En concreto, debido al gran interés generado los últimos años por la investigación de las proteínas BET, y su implicación directa en el cáncer y la inflamación, se han generado múltiples avances tanto en el descubrimiento como en el desarrollo de potenciales inhibidores químicos selectivos de moléculas de la familia, entre ellos, el bromodominio más estudiado hasta la fecha BDR4, que los hace una buena herramienta en la regulación de la transcripción génica de la cromatina (Smith & Zhou, 2016).

### 2.4.1. Proteínas BET

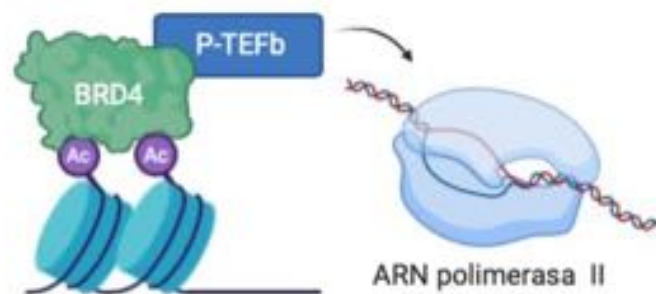
La familia de proteínas BET, son lectores epigenéticos que modulan directa o indirectamente la expresión génica reconociendo los residuos de lisina acetilados de las colas de las histonas y participan en la patogénesis del cáncer (Stathis & Bertoni, 2018). Una regulación epigenética anormal puede contribuir al inicio y la progresión del cáncer y afectar el fenotipo de CSC (Dawson & Kouzarides, 2012; Malta et al., 2018). A través de un programa epigenético desregulado, los tumores pueden aumentar la cantidad de CSC, lo que sugiere que la maquinaria epigenética es esencial para el mantenimiento de la identidad de las células madre y, por tanto, de la *stemness* del tumor.

La familia de proteínas BET consta de cuatro miembros; BRD2, BRD3, BRD4 (expresadas en todas las células, incluidas las células de cáncer de mama), y BRDT (solo se expresa en las líneas germinales de los testículos y los ovarios, y muy rara vez en el cáncer de mama) que están conformadas por dos bromodominios conservados en tándem (BD1 y BD2) y un dominio extraterminal (ET) variable. Además BRD4 y BRDT presentan un dominio C-terminal (CTD) (Cheng et al., 2019; Filippakopoulos & Knapp, 2014) (Figura 12). Estas proteínas desempeñan diferentes funciones en la regulación de la transcripción y expresión génica, debido a que son capaces de reclutar a varios complejos de transcripción en sitios promotores específicos (Jain & Barton, 2017; Sahni & Keri, 2018; Shi & Vakoc, 2014).



**Figura 12. Representación esquemática de la estructura de las proteínas BET: BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT.** Las proteínas BET están conformadas por dos bromodominios conservados en tándem (BD1 y BD2) y un dominio extraterminal (ET) variable. Además, BRD4 y BRDT contienen un dominio C-terminal (CTD). Creada por Miriam Nuncia Cantarero.

Las regiones BD reconocen y se unen a lisinas acetiladas en colas de histonas (histonas H3 y H4) y factores de transcripción. El dominio extraterminal está involucrado en interacciones proteína-proteína con proteínas como E2F y el antígeno nuclear latente del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (Denis et al., 2000; Platt et al., 1999). BRD4 y BRDT tienen un motivo adicional de C-terminal que vincula su función de lector con la elongación transcripcional: después de la unión del BRD4/T a las histonas acetiladas, el motivo de C-terminal interactúa con el complejo del factor positivo de elongación (P-TEFb) (Bisgrove et al., 2007), un complejo formado por la ciclina dependiente de quinasa 9 (CDK9) y su activador, la ciclina T. Esto permite que la P-TEFb se dirija a los promotores de la zona que tiene que transcribirse y produzca la fosforilación de la ARN Polimerasa II (RNAPII). Esta fosforilación activa la RNAPII iniciando la fase de elongación de la transcripción (*Figura 13*) (Sahni & Keri, 2018).



*Figura 13: Mecanismo de acción de BRD4. Los BD de BRD4 se unen a las histonas acetiladas promoviendo la activación de la ARN polimerasa mediante su activación por P-TEFb. Creada por Miriam Nuncia Cantarero.*

#### 2.4.2. BRD4

Una de las proteínas BET más estudiada y caracterizada en el cáncer de mama es BDR4. Al igual que otros miembros de la familia, esta proteína interactúa con histonas acetiladas para ensamblar complejos de cromatina y activadores de la transcripción en sitios promotores específicos. Sin embargo, a diferencia de las demás, BRD4 es la proteína BET

que más se amplifica/sobreexpresa en el subtipo de TNBC en comparación con el tejido mamario normal (Kadota et al., 2009; Sahni & Keri, 2018).

Por otro lado, se ha visto que BRD4 es esencial durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de las CSC estimulando la expresión de genes relacionados con la *stemness* (Gonzales-Cope et al., 2016; Liu et al., 2014, p. 4; Wu et al., 2015). Como hemos comentado en el punto 1.3.1.1, la población de CSC está involucrada en el inicio y la progresión del tumor, la resistencia a las quimioterapias citotóxicas tradicionales y en consecuencia en la metástasis y la recurrencia tumoral (Nilendu et al., 2018), lo que las convierte en un objetivo muy atractivo en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del TNBC.

Los inhibidores de BET (iBET) han demostrado actividad en el resto de los subtipos de cáncer de mama (luminales A, luminales B, HER2+ y TNBC). Concretamente, inhiben la expresión de diferentes factores de transcripción y de genes involucrados en ciclo celular (*AURKB*, *CICLINA D*, *E2F*); en proliferación (*MYC*, *FOSL1*, *WNT5A*); en angiogénesis (*ID1*, *IL1B*, *NRP1*); en *stemness* (*FST*, *HIST1H4*, *LIF*, *NRP1*); y en metástasis (*JAGGED1*, *NOTCH1*) (Ocaña et al., 2017).

### 2.4.3. Inhibidores de BET

Los primeros iBET desarrollados fueron JQ1 y I-BET. Mas adelante se sintetizaron múltiples derivados más como I-BET151, I-BET762, MS417 y OTX015. Estos compuestos muestran efectos similares a JQ1 y se encuentran en fases clínicas de investigación en diferentes tipos de cáncer hematológicos y tumores sólidos (Filippakopoulos et al., 2010; Sahni & Keri, 2018). La mayoría de ellos inhiben a los 4 miembros de la familia de proteínas BET, pero actualmente se están desarrollando inhibidores selectivos de BRD4.



El primer tumor en el que se mostró su eficacia fue en el carcinoma de la línea media NUT y posteriormente en neoplasias hematológicas y tumores sólidos como glioblastoma, meduloblastoma, carcinoma hepático, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de mama (Nieto-Jimenez et al., 2020; Nieto-Jiménez et al., 2017; Pérez-Salvia & Esteller, 2016).

- **OTX-015:** OTX-015 (Figura 16) es un iBET, muy similar a JQ1, de administración oral, con especificidad por BRD2 y BRD4, que actualmente se encuentra en la fase II/Ib de los ensayos clínicos en diversos tumores sólidos, después de comprobar que posee un efecto antiproliferativo y proapoptótico tanto *in vivo* como *in vitro* en diversos tumores hematológicas y sólidos como neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de próstata y cáncer de mama (Alqahtani et al., 2019; Riveiro et al., 2016).

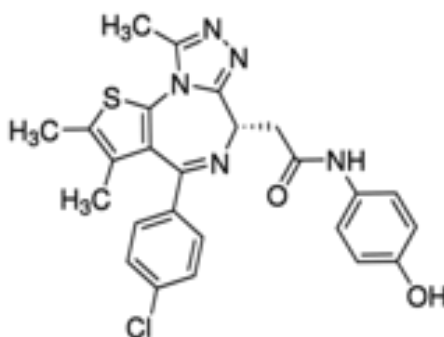


Figura 16. Estructura química OTX-015.

## 2.5. Vías de transducción de señales en cáncer de mama

Como se ha detallado a lo largo de la primera parte de la introducción a esta tesis, el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial que, debido a la adquisición de cambios genéticos y epigenéticos, es impulsada por la desregulación de las vías de señalización celular.

En el control de estas vías, tanto los factores de crecimiento presentes en el microambiente como las enzimas que regulan y transmiten las señales a sus receptores son imprescindibles, con lo que su estudio juega un factor determinante en el desarrollo del cáncer y la aparición metástasis (Butti et al., 2018).

### 2.5.1. Las proteínas tirosina quinasa (TK)

Las proteínas tirosina quinasa (TK) son enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato en forma de ATP a los residuos de tirosina de muchas proteínas relevantes, lo que hace que se fosforilen y luego transfieran la señal desencadenando una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos para regular el crecimiento, la diferenciación, y la muerte celular.

Según su estructura, se pueden dividir en dos categorías: receptores TK (RTK) y TK no receptores (NRTK). El análisis de los datos del genoma humano muestra que hay 518 genes de quinasa en el cuerpo humano, de los cuales 90 han sido identificados como TK (58 RTK y 32 NRTK) (Jiao et al., 2018; Manning et al., 2002).

#### 2.5.1.1. Los receptores tirosina quinasas (RTK)

Los RTK constituyen una clase de receptores de la superficie celular que desempeñan un rol clave en la progresión del cáncer. Tras ser estimulados por las señales del microambiente, los RTK pueden unirse a ligandos y fosforilar residuos de tirosina de proteínas diana, que conllevan a un cambio conformacional (dimerización u oligomerización) y que producen como resultado la activación de moléculas de



señalización que desencadenan la activación de rutas de señalización concretas en las células tumorales para transmitir esta información. Las vías importantes que se sabe que son activadas por RTK incluyen la MAPK, la quinasa Janus (JAK)/transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) y la PI3K/AKT/mTOR (Butti et al., 2018; J et al., 2016; R & A, 2017). Estas vías tienen un papel protagonista en la regulación de la propagación del tumor, la angiogénesis y la metástasis. Además, estas vías también son esenciales para una interacción recíproca de las células tumorales y del estroma (Butti et al., 2018).

Se han caracterizado 58 RTK diferentes, que se han dividido en 20 subfamilias atendiendo a sus características estructurales y específicas. Todos los RTK comparten un dominio de unión de ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que tiene actividad TK.

En el caso concreto del cáncer de mama se pueden encontrar varios tipos de RTK sobreexpresados, como los EGFR, los VEGFR, los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR) y los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Su sobreexpresión está asociada con una mayor agresividad y una peor supervivencia general libre de la enfermedad.

#### 2.5.1.2. Las PTK no receptoras (NRTK): La familia de quinasas de SRC (SFK)

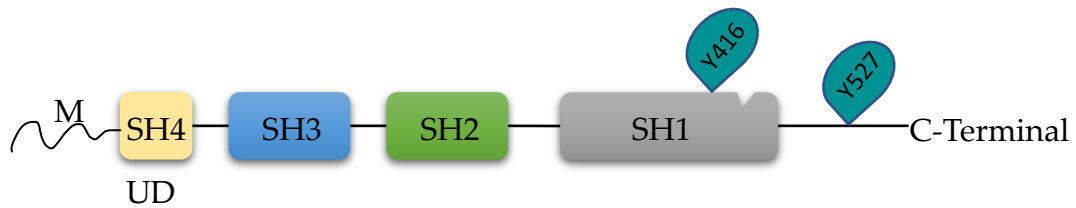
Las NRTK generalmente no tienen estructura extracelular. Habitualmente, están acoplados a la membrana celular o presentes en el citoplasma. En este caso encontramos la quinasa Abl, o a la familia de quinasas de SRC. Las NRTK reciben las señales del microambiente principalmente a través de receptores de citocinas, receptores de células T, receptores de linfocitos B, receptores de inmunoglobulinas, etc. que producen la fosforilación de su tirosina para formar un complejo de transducción de señales, y luego activar la señalización aguas abajo, promover la proliferación de células y conducir a la formación de tumores (Jiao et al., 2018).

La familia de quinasas de SRC (SFK) engloba a las 11 proteínas no receptoras Blk, Brk, Fgr, Frk, Fyn, Hck, Lck, Lyn, SRC, Srm, y Yes, de los cuales únicamente SRC, Fyn, Frk, Brk y Yes se expresan en la mama (Bagnato et al., 2020; S. Zhang & Yu, 2012).

Todas ellas comparten una estructura similar compuesta por cuatro dominios de homología SRC comunes (SH1-SH4). En el extremo N-terminal encontramos un dominio SH4 que puede miristoilarse y/o palmitoilarse y en ese caso puede funcionar como un radar que le permite a la SFK localizar la membrana celular y unirse a ella. A continuación, un dominio único característico de cada quinasa individual, los dominios SH2 y SH3 que median las interacciones proteína-proteína, y finalmente un dominio catalítico SH1, que contiene un sitio regulador positivo (tirosina Y416 fosforilada), y el extremo C-terminal que actúa como regulador principal negativo, ya que contiene un residuo de tirosina Y527 fosforilado que permite a la quinasa estar desactivada (Bagnato et al., 2020; Shah et al., 2018).

Por tanto, para que una SFK se active tiene que autofosforilarse en el residuo Y416 del dominio SH1 y no estarlo o desfosforilarse en el residuo Y527 del C-terminal, de esta forma se da acceso a un bolsillo de acoplamiento para otras proteínas involucradas en la transducción de señales (Moshirfar et al., 2020). A su vez, la activación de las SFK puede estar promovida por interacción de SH2/SH3 ya sea, mediante su interacción con proteínas adaptadoras (como cdc2 durante la mitosis), la regulación redox (oxidando los residuos Cys245 y Cys487 presentes en los dominios SH1 y SH2) o por un aumento de la transcripción de los RTKs (EGFR, HER2, PDGFR, FGFR, VEGFR), integrinas, efrinas o Fak (Bagnato et al., 2020; Finn, 2008; Moshirfar et al., 2020; Shah et al., 2018).

Por el contrario, cuando la SFK se fosforila el residuo Y530 del C-Terminal se inactiva y se plega evitando su unión a los residuos de tirosina fosforilados (*Figura 7*).



**Figura 7. Estructura de SRC y la familia de quinasas de SFK.** SRC es una quinasa no receptora de 60 kDa formada por un sitio miristilado en el extremo N-terminal (M), tres dominios de homología de SRC (SH), y un extremo C-terminal. SH1 es el dominio catalítico y se autofosforila en la Y419. Para SRC la cola del extremo C-terminal tiene un residuo de tirosina regulador negativo (Y530 en SRC). El dominio único es diferente entre las diferentes SFK. Creada por Miriam Nuncia Cantarero.

La SFK que da nombre a la familia es la NRTK SRC, activada durante la fase G2/M del ciclo celular (Roskoski, 2004). Está sobrepresada en tumores sólidos, entre ellos el cáncer de mama (Elsberger et al., 2010; Verbeek et al., 1996; Wilson et al., 2006).

SRC tiene un rol fundamental en la diferenciación y proliferación celular, la invasión, adhesión, la migración, la autofagia, la diferenciación, la supervivencia y la angiogénesis tras activar las rutas de señalización descendientes al fosforilar residuos de tirosina. Además todas estas vías acaban afectando a la sensibilidad a los tratamientos (Figura 8) (Nam et al., 2005).

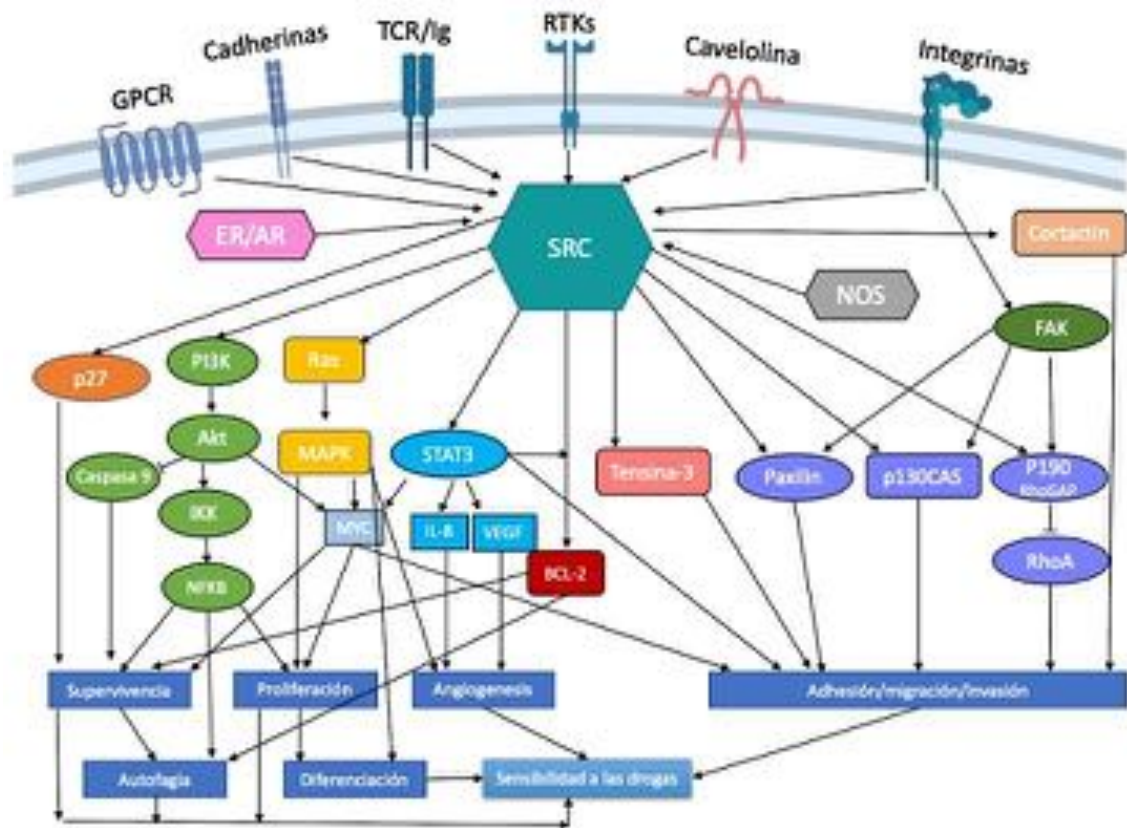


Figura 8. El SRC juega un papel clave en varias vías de transducción de señales implicadas en la supervivencia, la proliferación, la adhesión, migración e invasión celular, la angiogénesis, la autofagia, la diferenciación y la sensibilidad a la quimioterapia en las células de cáncer de mama. Creada por Miriam Nuncia Cantarero.

Dado su papel en estas funciones, la inhibición de SRC puede constituir una opción terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer de mama. (Bagnato et al., 2020; Finn, 2008; Hiscox & Nicholson, 2008; Moshirfar et al., 2020).

Entre todos los inhibidores disponibles de las SFK cabe destacar el inhibidor de administración oral dasatinib, ya que presenta una alta especificidad por las SFK y, en concreto, por la NRTK SRC (Figura 9). Hasta ahora se han realizado más de 300 ensayos clínicos en casi todos los tipos tumorales con dasatinib, y alrededor de 60 siguen en curso (Lindauer & Hochhaus, 2018). Actualmente, el dasatinib como tratamiento para el cáncer de mama se encuentra en fase II, según los registros de la FDA.

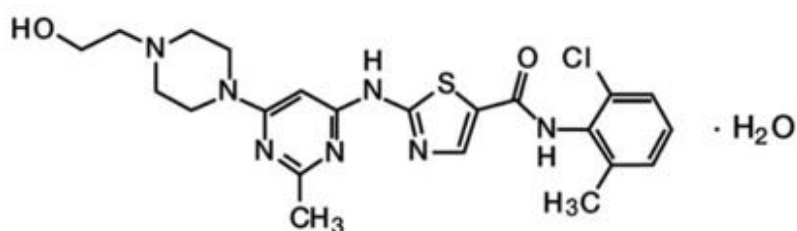


Figura 9. Estructura química del dasatinib.

A través de la inhibición de SRC, el dasatinib bloquea la duplicación celular, la migración e invasión, y desencadena la apoptosis de las células tumorales. También disminuye la metástasis de las células tumorales y actúa en el microambiente tumoral. Además, sensibiliza y resensibiliza las células tumorales a la quimioterapia, a la terapia inhibidora del EGFR, a la terapia antiangiogénica o a la antihormonal (Montero et al., 2011). Dentro del cáncer de mama, estudios anteriores han demostrado como dasatinib tiene un efecto antitumoral mayor en el subtipo TNBC que en los demás y a su vez este efecto se asocia con una pérdida significativa de población CSC (Kurebayashi et al., 2010; Tian et al., 2018; X. H.-F. Zhang et al., 2009).

## 2.5.2. Los transductores de señales y activadores de transcripción: la familia de factores de transcripción STAT

La familia de proteínas que actúan como moléculas de señalización citoplasmática y de los factores de transcripción después de la translocación nuclear (STAT) está compuesta por 7 miembros muy similares tanto estructural como funcionalmente: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, y STAT6. Todas las proteínas STAT comparten la misma estructura (Figura 10); un dominio de aminoácidos (NH<sub>2</sub>), un dominio de hélice superenrollada (CCD) para la unión con proteínas interactivas, un dominio de unión de ADN (DBD), un dominio de unión, un dominio de homología 2 (SH2) de SRC para la fosforilación y la dimerización, y un dominio de transactivación en el extremo C-terminal (TAD) (Furtek et al., 2016; Qin et al., 2019).



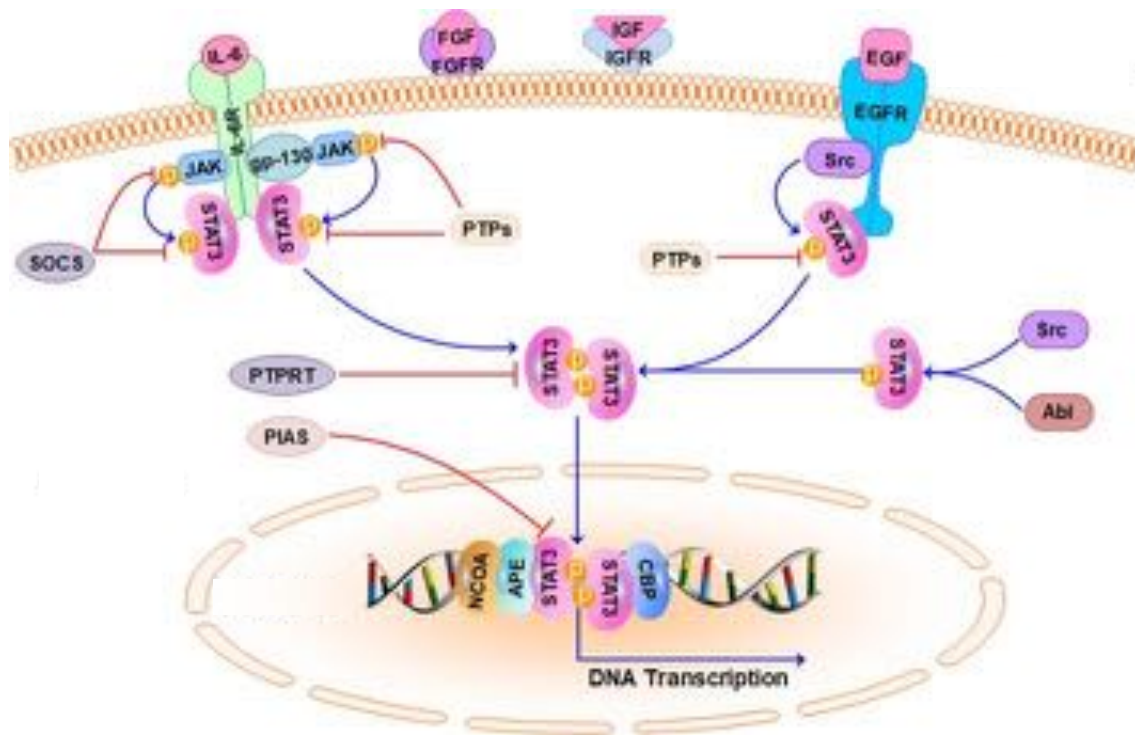
**Figura 10. Representación esquemática de la estructura de las proteína STAT3.** Las proteínas STAT comparten todas la misma estructura. Están conformadas un dominio amino terminal (NTD), un dominio de hélice superenrollada (CCD), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de unión (LD), un dominio de homología a SRC (SH2) y finalmente un dominio de transactivación (TAD) en el extremo C-terminal (CTD). Creada por Miriam Nuncia Cantarero.

STAT3 es un miembro de la familia de proteínas STAT que actúa como un nodo de señalización para múltiples vías oncogénicas, y por lo tanto suele encontrarse activado de forma constitutiva en el cáncer de mama (Qin et al., 2019; Tolomeo & Cascio, 2021). STAT3 puede activarse en respuesta a citoquinas, interleuquinas y factores de crecimiento. En respuesta a los factores de crecimiento STAT3 se activa tras su fosforilación en la tirosina 705 por parte de las JAKs, en cambio, cuando se activa por en respuesta a las citoquinas e interleuquinas se fosforila en la serina 727 por la activación de SRC quinasa (Tkach et al., 2013).

Con el paso de los años, se ha observado cómo la desregulación de los niveles de expresión de STAT3 se produce en una gran variedad de líneas celulares tumorales, con lo que búsqueda de inhibidores efectivos contra esta proteína está en la línea de fuego con el fin de desarrollar nuevas terapias contra el cáncer.

En el TNBC, STAT3 no solo se encuentra sobreexpresada y activada constitutivamente actuando como un factor de transcripción para activar la expresión de sus genes diana descendientes, sino que también se localiza en las mitocondrias y regula sus funciones, regulando diversos aspectos de las células TNBC (Tolomeo & Cascio, 2021).

STAT3, participa en la regulación de la iniciación y progresión tumoral, la metástasis, la angiogénesis, la resistencia a la quimioterapia, la supresión inmunológica, la autorrenovación y el mantenimiento de las células madre (*Figura 11*). Además, su sobreexpresión se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad (Qin et al., 2019).



**Figura 11.** La vía de señalización del STAT3 en las células cancerosas. En condiciones fisiológicas normales, la activación de STAT3 está estrictamente controlada por los inhibidores endógenos, incluyendo el inhibidor proteínico de STAT activado (PIAS), el supresor de la señalización de citoquinas (SOCS), y varias proteínas tirosina fosfatasas (PTP). Una vez que las citoquinas ascendentes (por ejemplo, IL-6) o los factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, FGF y VEGF) se unen a los receptores RTK de la superficie celular, el STAT3 es fosforilado y activado por JAK o SRC. Las tirosina quinasa no receptoras (por ejemplo, SRC y Abl) también fosforilan STAT3. El STAT3 fosforilado se somete a la dimerización y se traslada del citoplasma al núcleo. El STAT3 activado se une aún más al ADN y a sus coactivadores (por ejemplo, NCOA, APE y CBP) e induce la transcripción de sus genes diana descendentes. Obtenida de (Qin et al., 2019).

Hoy en día, existen diversos inhibidores aguas arriba de STAT3 que se encuentran en ensayos clínicos que están obteniendo resultados prometedores (Furtek et al., 2016), por este motivo se espera que inhibidores directos de STAT3 obtengan resultados más significativos. De hecho, estudios preclínicos y clínicos recientes sobre el papel que juega STAT3 en el TNBC y su inhibición a través de inhibidores específicos han demostrado su eficacia en la inhibición del crecimiento tumoral y la metástasis en TNBC (Furtek et al., 2016; Ma et al., 2020, p. 3). Por lo que este campo es todavía un campo en evolución.



### 2.5.3. Ruta PI3K/AKT/mTOR

Las fosfatidilinositol 3-quinazas (PI3Ks) son una familia de quinazas lipídicas heterodiméricas intracelulares que responden a señales extracelulares, como los niveles de insulina del metabolismo, los factores de crecimiento y a otras señales del microambiente. Una vez activadas, movilizan vías descendientes como las de AKT y mTOR. Las PI3K desempeñan un papel fundamental en la regulación de muchas funciones biológicas, entre ellas el crecimiento, la proliferación, la supervivencia, la diferenciación, el metabolismo, la motilidad, la estabilidad genómica, la síntesis de proteínas y la angiogénesis de las células (Ellis & Ma, 2019).

La familia de las PI3K la podemos dividir en 3 clases atendiendo a su estructura y sus propiedades bioquímicas características (PI3KI, PI3KII, PI3KIII). La clase I es la que tiene un papel más importante en la oncogénesis y está formada por heterodímeros de la subunidad catalítica de 110 kDa (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$ , o p110 $\delta$ ) y una subunidad reguladora de 85kDa (p85), que recibe señales de activación ascendentes de los RTK (HER, FGFR, y IGF-1) y de los receptores acoplados a proteínas G (Thorpe et al., 2015).

Entre todas las vías de señalización existentes, la hiperactivación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR es una de las más frecuentes en los diversos tipos de cáncer existentes, incluido el cáncer de mama (Alzahrani, 2019). El gen PIK3CA se encuentra comúnmente desregulado genéticamente, tanto por mutaciones a nivel somático como por amplificación produciendo una desregulación del crecimiento tumoral y de la resistencia a drogas (Ellis & Ma, 2019).

En particular, la sobreexpresión de AKT se asocia con la resistencia al tratamiento, tanto a quimioterapia como a radioterapia, y su respuesta. AKT activa la supervivencia celular mediada por factores de crecimiento, para promover la proliferación y el crecimiento celular inhibiendo finalmente la apoptosis mediante la inactivación de Bad (antagonista Bcl-2 en el proceso de muerte celular).

mTOR es una serina/treonina quinasa que actúa como un efector descendente de la señalización de PI3K y AKT. mTOR interactúa con otras moléculas proteicas y forma dos complejos diferentes, mTORC1 (complejo mTOR 1) y mTORC2 (complejo mTOR 2). Aunque la molécula mTOR es un componente básico de los dos complejos, éstos ejercen funciones variables al interactuar con diferentes ligandos. El mTORC1 activo fosforila y activa p70S6K y 4EBP1 para regular el crecimiento anabólico de las células a través de la translocación del ARNm al núcleo y la síntesis de proteínas, el metabolismo de la glucosa y la síntesis de lípidos. El otro complejo, mTORC2, fosforila AKT en ser473, lo que promueve la hiperactivación de AKT (Alzahrani, 2019).

Se ha demostrado que la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT/ mTOR conduce a la regresión de los tumores humanos en los que se encuentra hiperactivada. Actualmente la FDA ha aprobado varios inhibidores de esta vía, tras haberse completado con éxito muchos ensayos clínicos a varios niveles y haberse demostrado su potencial y seguridad. Existen varias clases generales de inhibidores que atacan la integridad de esta red: inhibidores pan-PI3K, inhibidores específicos de la isoforma de PI3K, inhibidores de AKT, análogos de la rapamicina o inhibidores mTOR, e inhibidores PI3K/mTOR (Alzahrani, 2019, p. 3; Ellis & Ma, 2019; Fruman & Rommel, 2014).

3 y 4

H I P Ó T E S I S Y  
O B J E T I V O S

La mente que se abre a una nueva idea  
jamás volverá a su tamaño original

ALBERT EINSTEIN



### 3. Hipótesis

Las propiedades stemness de las CSC y los factores secretados por la ASC<sup>TNBC</sup> presentes en el MT mamario promueven la adquisición de resistencia, su inhibición podría generar tumores menos agresivos, así como revertir la resistencia a los agentes quimioterápicos.

### 4. Objetivo General

Identificar dianas terapéuticas en TNBC dirigidas tanto a la masa tumoral como a su MT.

#### 4.1. Objetivos específicos

1. Identificar una firma genómica relacionada con *stemness* en respuesta a inhibidores de BET en TNBC.
2. Investigar cómo la inhibición de BET afecta a los niveles de expresión de los genes identificados en diversos modelos celulares y animales de TNBC.
3. Estudiar si la inhibición de BET altera las características de autorrenovación y crecimiento de la población CSC de TNBC.
4. Evaluar el papel potencial de esta firma *stemness* en la respuesta a tratamiento y en la progresión de la enfermedad.
5. Diseñar un modelo sencillo que mimetice el MT de TNBC “*ex vivo*”.
6. Dilucidar si los factores secretados por las CAAT o las AdMSC ejercen un papel en la tumorigénesis, y el crecimiento del tumor de las células TNBC.
7. Estudiar si el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC juega un papel la capacidad invasiva y la metástasis en las células de TNBC.
8. Investigar si el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> interfiere en la viabilidad celular, la muerte celular, la recurrencia del tumor y la capacidad metastásica de las células TNBC tras la exposición a un tratamiento quimioterápico.
9. Determinar las dianas que activa el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> e inhibirlas farmacológicamente para observar su comportamiento sobre las células tumorales.

# 5

## M A T E R I A L Y M É T O D O S

Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir.

ISAAC NEWTON



# 5. Material y métodos

## 5. Estudios *in vitro*

### 5.1. Cultivos celulares

#### 5.1.1. Cultivos primarios humanos

##### 5.1.1.1. Aislamiento y caracterización de las AdMSC

Las AdMSC se obtuvieron a partir de tejido adiposo peritumoral (CAAT) de pacientes con TNBC (AdMSC<sup>TNBC</sup>). Inicialmente el anatomopatólogo del biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA) nos proporcionó los fragmentos de CAAT mamario (limpio de vasos sanguíneos y de tejido conectivo) procedente de pacientes con TNBC sometidos a cirugía. Cada una de las muestras se conservó en frío en tampón fosfato salino (PBS; Sigma Aldrich) hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, mediante la técnica de cultivo de explante estándar para obtención de MSC (Priya, Sarcar, Majumdar, & SundarRaj, 2014), pero adaptada a CAAT (*Figura 12*), se realizaron los cultivos primarios.

Inicialmente, cada muestra de CAAT se pesó y, posteriormente, se lavó varias veces con PBS suplementado con un coctel de antibióticos (ciprofloxacino, anfotericina B, y penicilina/estreptomicina) con el fin de lavar y esterilizar la muestra de una posible contaminación. A continuación, se troceó en fragmentos más pequeños de 5mm<sup>3</sup> aproximadamente, se lavaron en PBS para eliminar los restos generados por la fragmentación y se distribuyeron de manera uniforme sobre una placa de cultivo de 60 mm. Tras 5 minutos de espera, para facilitar la adherencia de los fragmentos de CAAT a la superficie de la placa, se añadió medio de cultivo K.O. DMEM (500µL) alrededor de cada fragmento de manera cuidadosa evitando de este modo rompa la unión de los fragmentos de CAAT a la placa de cultivo. Una vez todos los fragmentos estuvieron cubiertos por el medio de cultivo se trasladaron al incubador de células. Cada dos o tres días, se fue añadiendo medio de cultivo para evitar la evaporación, pero teniendo en cuenta que los fragmentos de CAAT pueden flotar por un exceso de medio. Tras un



periodo de 7 a 10 días de incubación, se observó como parte de las AdMSC<sup>TNBC</sup> que se encontraban en el interior del trozo de grasa, habían migrado a la placa, por lo que se procedió a la retirada de los fragmentos de grasa. Pasados 14 días del inicio del explante, la placa alcanzó una alta confluencia y se llevó a cabo el pase 1 con éxito. Los pases posteriores se usaron para expandir las células con el fin de poder generar varios stocks de células que fueron convenientemente crioconservadas en medio de congelación.

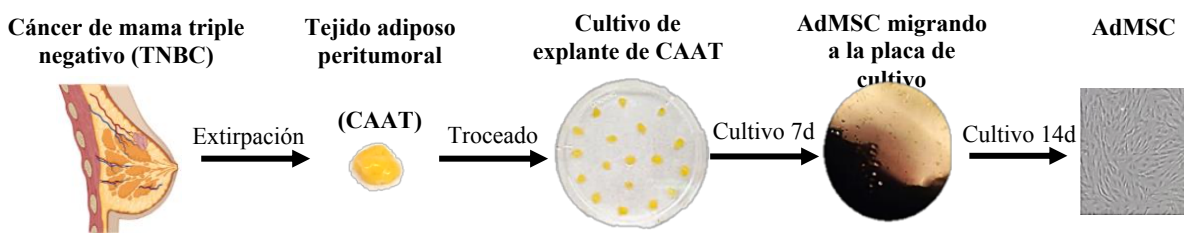


Figura 12. Esquema del protocolo de aislamiento de AdMSC peritumorales de un paciente de TNBC (AdMSC<sup>TNBC</sup>).

La pureza de las líneas celulares AdMSCTNBC obtenidas a partir de un cultivo primario humano fue corroborada mediante dos aproximaciones (Figura 13).

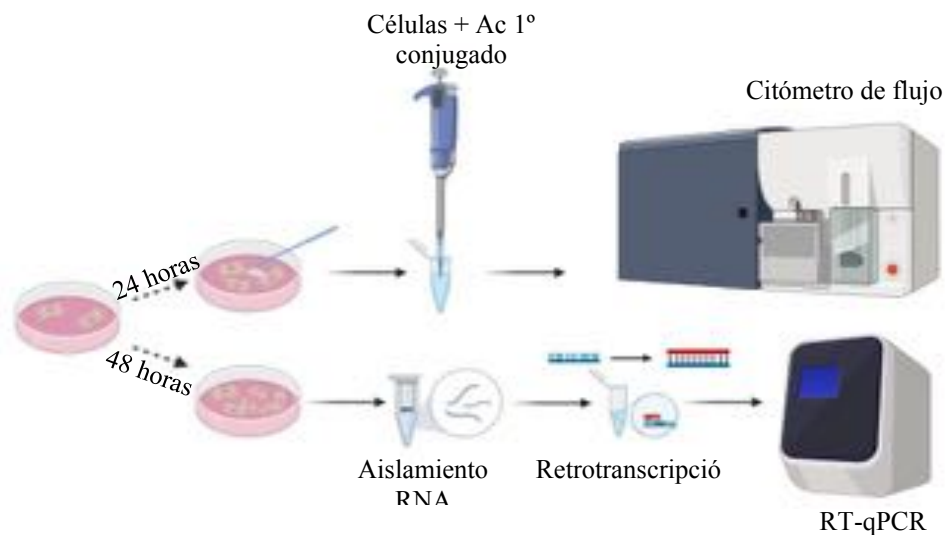
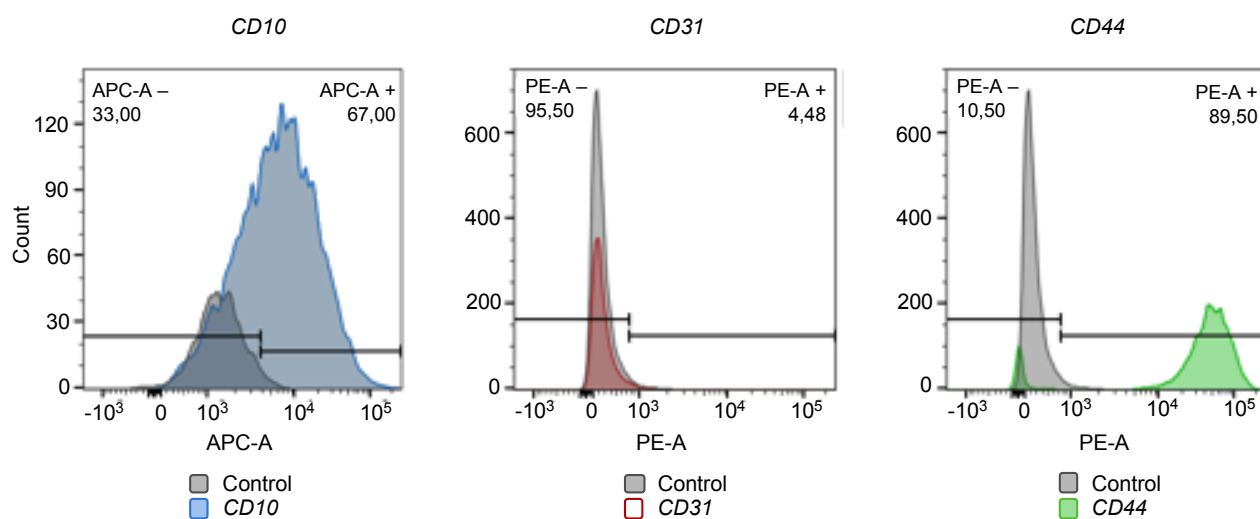


Figura 13. Resumen gráfico de los métodos de caracterización de las AdMSC<sup>TNBC</sup>

La primera de ellas consistió en analizar los marcadores de superficie celular presentes mediante citometría de flujo (técnica explicada con detalle en el punto 5.11) para ello, las células AdMSC<sup>TNBC</sup> se cultivaron en una placa de 6 pocillos (200.000 células/pocillo) en su medio fresco completo KO DMEM. 24 horas más tarde, las células se recogieron de la placa en PBS frío con la ayuda de un raspador, seguidamente se hicieron dos lavados consecutivos en PBS frío por centrifugación a 120 g durante 5 minutos y se incubaron con 2,5 ul de anticuerpo primario (CD31, CD44, CD10, IgG) conjugado con PE-A o APC-A tamponado en PBS+2% BSA frío durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS+2% BSA en frío por centrifugación a 120 g durante 5 minutos y se analizaron con el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). El análisis de los datos se realizó con la herramienta bioinformática Flowjo (10.6.2) (Figura 14).



**Figura 14. Caracterización AdMSC<sup>TNBC</sup> por citometría de flujo.** Las células AdMSC tenían un mayor nivel de los marcadores CD10, y CD44 respecto al control característico de las AdMSC, y mostraron un marcaje negativo del anticuerpo CD31 en su superficie.

La segunda aproximación que se hizo fue evaluar la expresión de un panel de genes que pueden definir la población de AdMSC<sup>TNBC</sup> (CD105, CD90, CD73, CD49, CD44, CD10, HLA-DR y CD31). Se obtuvieron los ARNm de las células AdMSC<sup>TNBC</sup> y HEK293T crecidas

durante 48 horas para su caracterización y se determinaron los niveles de los genes indicados mediante el protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). El protocolo de la RT-qPCR se detalla más adelante en la sección 5.6.1, en la página 13. Como se muestra en la figura, las células analizadas tenían una expresión génica consistente con células MSC:  $CD105+$ ,  $CD90+$ ,  $CD73+$ ,  $CD49+$ ,  $CD44+$ ,  $CD10+$ ,  $HLA-DR+$  y  $CD31-$ . (Figura 15)

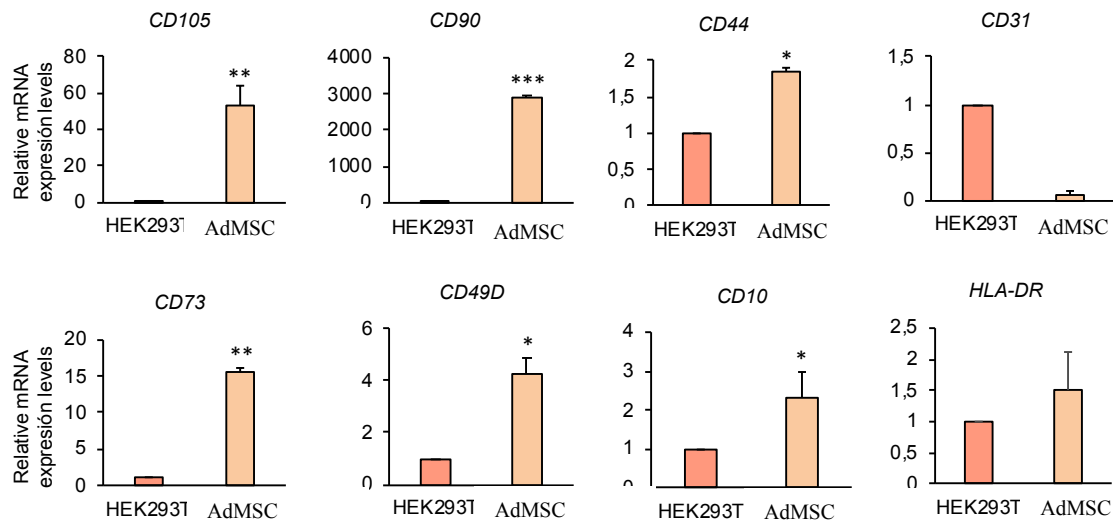


Figura 15. Caracterización AdMSC<sup>TNBC</sup> por RT-qPCR.

### 5.1.2. Líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo (Tabla 1) se mantuvieron en cultivo en incubadores en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Todos los medios de cultivo utilizados para mantener las células fueron adquiridos en Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Del mismo modo, todos los suplementos contenidos en el medio de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de estas líneas celulares fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany St. Louis, MO, EE. UU.). Todas las líneas celulares inmortalizadas fueron comprobadas mediante análisis del grado

de concordancia de marcadores STR. El porcentaje de similitud comparado con bases de datos de líneas celulares como ATCC, DSMZ, JCRB y RIKEN fue de un 85-95%, siendo a partir del 80% cuando podemos asegurar que tienen la suficiente concordancia para considerarlas válidas

#### *5.1.2.1. Cultivos adherentes*

Para la consecución de los objetivos específicos planteados, se utilizaron líneas celulares no tumorales (HEK293T y AdMSC<sup>TNBC</sup>) y líneas celulares tumorales inmortalizadas (MDA-MB-231, BT-549, HS 578T, HCC 3153).

#### *5.1.2.2. Cultivos celulares en suspensión*

Las líneas celulares en suspensión utilizadas fueron las tumorosferas (TS) de MDA-MB-231 y TS de BT-549). Estas células se generaron en nuestro laboratorio a partir de las líneas celulares tumorales adherentes (MDA-MB-231 y BT-549). Para ello, las células adherentes se separaron de la placa con la ayuda de un raspador en PBS. A continuación, se lavaron mediante centrifugación 5 min, 900rpm con PBS para asegurarnos que se ha eliminado el medio completo anterior totalmente, ya que estos cultivos deben crecer en completa ausencia de suero bovino fetal (FBS). Finalmente, el PBS fue remplazado con medio fresco completo de TS.

**Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.**

Línea celular	Origen	Procedencia	Crecimiento	Medio de cultivo
HEK293T	Línea celular humana embrionaria epitelial de riñón	ATCC	Adherente	DMEM 10% FBS + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
AdMSC <sup>TNBC</sup>	Células madre mesenquimales derivadas de CAAT de una paciente con cáncer de mama TBNC	CHUA	Adherente	KnockOut DMEM (K.O. DMEM) 10% FBS + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mama. Derivado de sitio metastásico: Efusión pleural	ATCC	Adherente	DMEM 10% FBS inactivado + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
BT-549	Carcinoma ductal de mama	ATCC	Adherente	RPMI 10% FBS inactivado + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
HS 578T	Carcinoma epitelial de mama	ATCC	Adherente	DMEM 10% FBS inactivado + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
HCC3153		ATCC	Adherente	RPMI 10% FBS inactivado + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina
MDA-MB-231 TS	Línea celular MDA-MB-231	CRIB	Suspensión	DMEM-F12 + Suplemento B27 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina + 70 µg/ml Anfotericina B
BT-549 TS	Línea celular BT-549	CRIB	Suspensión	DMEM-F12 + Suplemento B27 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) + 20ng/ml bFGF + 20ng/ml EGF + 100 µg/ml P/S + 2 mM Glutamina + 70 µg/ml Anfotericina B

## 5.2. Compuestos quimioterápicos

Los compuestos quimioterápicos utilizados a lo largo de toda la investigación son los siguientes:

- CDDP: fue adquirido en la casa comercial Pharma nostrum, S.A. Mantenido a temperatura ambiente en oscuridad.
- DOXO: fue adquirido en la casa comercial Pfizer. Mantenido a -20°C.
- DTX: fue adquirido en la casa comercial Pharma nostrum, S.A. Mantenido a -20°C.

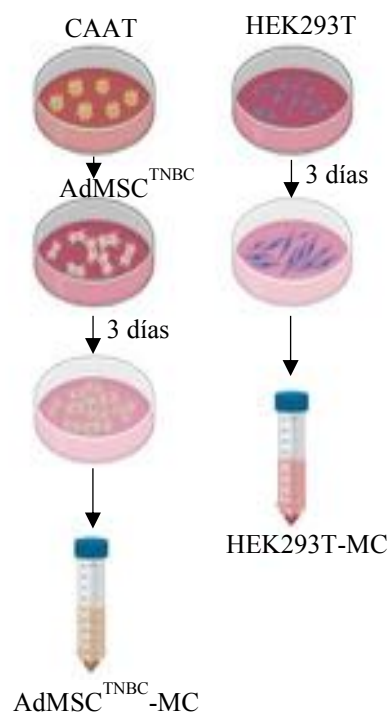
## 5.3. Inhibidores selectivos

Los iBET utilizados en este estudio, JQ1 y OTX- 015 (Selleckchem, Houston, TX, EEUU) y el inhibidor selectivo de SRC dasatinib (Selleckchem, Houston, TX, EEUU) fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich), alicuotados y mantenidos a -20°C hasta su uso. La concentración de DMSO presente en los pocillos tratados, se tuvo en cuenta para llevar a cabo controles adecuados para cada experimento.

## 5.4. Preparación y caracterización de los medios condicionados

Para la preparación del medio acondicionado (MC) de CAAT, se colocaron fragmentos de CAAT de 5mm<sup>3</sup> aproximadamente una placa de 60mm en medio fresco completo con antibióticos. 72 horas más tarde, el medio condicionado secretado por las CAAT se recolectó, centrifugó y filtró antes de ser almacenado a -80°C hasta su uso.

La preparación del MC a partir de HEK293T (HEK293T-MC) y de ADMSC<sup>TNBC</sup> (AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC) se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Inicialmente, se sembraron 500.000 células por placa de 100mm. Después de 24 horas, el medio fue reemplazado por un medio completamente fresco (K. O. DMEM + 10% FBS + Antibióticos). 72 horas más tarde, el MC que contenía los factores secretados por estas células se recogió, se centrifugó y fue filtrado a través de una membrana de 0,22 $\mu$ m (Millipore) antes de ser alicuotado y guardado a -80°C hasta su uso. Para evaluar eficientemente el papel de los factores contenidos en los MC, las células TNBC fueron siempre preincubadas durante 6 horas con el MC antes de la exposición a las drogas.



*Figura 16: Esquema de la preparación del HEK293T-MC y del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC*

La concentración de proteínas de los MC se determinó mediante un ensayo de ácido bicinonínico siguiendo las instrucciones del proveedor (kit de ensayo de proteínas BCA, Thermo Fisher). 60 $\mu$ g de proteína se utilizaron para la evaluación del patrón de proteínas contenidas en el MC. Después de la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con azul de coomassie siguiendo el protocolo del proveedor (tinción de azul de coomassie, Thermo Fisher).

## 5.5. Evaluación de viabilidad y proliferación celular

### 5.5.1. Ensayos MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico comúnmente empleado para evaluar la viabilidad metabólica y proliferación celular. Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT, Sigma Aldrich) a formazán por la enzima mitocondrial oxidorreductasa succinato-deshidrogenasa, reflejando así la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y, en consecuencia,

el número de células viables presentes. El formazán es solubilizado mediante la adición de DMSO dando como resultado a una solución azul violácea.

Dicho en otras palabras, la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido cuando se mide su absorbancia. Por otro lado, la cantidad de señal generada depende de varios parámetros incluyendo: la concentración de MTT, la duración del periodo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Todos estos parámetros deben ser considerados al optimizar las condiciones de ensayo para generar una cantidad suficiente de producto que puede detectarse por encima del fondo.

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad y proliferación celular en las líneas de TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T, HCC3153) se sembraron 10.000 células/pocillo en su medio completo. Pasadas 24 horas, se reemplazó el medio por los MC utilizados como “pretratamiento” (K.O. DMEM, HEK293T-MC o ADMSC<sup>TNBC</sup>-MC), 6 horas después se trató cada pocillo con una concentración de fármaco determinada para llevar a cabo la titulación tras 48 horas de tratamiento.

Pasadas las 48 horas del tratamiento, se llevó a cabo el ensayo de MTT. Se aspiró el medio con ayuda de una bomba de vacío y fue sustituido por una solución de MTT a una concentración de 5mg/ml en DMEM sin rojo fenol (para evitar la interferencia en el ensayo colorimétrico).

Una vez fue añadido el compuesto, se incubó de 45 minutos a 1 hora a 37°C en oscuridad y pasado este tiempo, se retiró el medio con MTT sustituyéndolo por el mismo volumen de DMSO con el fin de disolver los cristales de formazán resultantes. Finalmente, tras 5 minutos se midió la absorbancia de la placa en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 555 nm tomando como longitud de referencia 690 nm con el fin de eliminar el ruido de fondo y medir un valor de absorbancia lo más certero posible.

$$A_{TOTAL} = A_{555} - A_{690}$$



La primera longitud de onda corresponde con el máximo de absorbancia del espectro de absorción y la segunda corresponde a una longitud de onda fuera del espectro, la cual consideramos que todo lo que mida a esta longitud de onda será ruido de fondo.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados en porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratar de esa condición, al cual se le dio el valor de 100%. A partir de estos porcentajes se calculó el porcentaje de células viables y se representó en una curva dosis-respuesta.

### 5.5.2. Análisis de la combinación de drogas: estudios de sinergias

El procedimiento que se siguió para los estudios de sinergias fue el mismo que para el MTT con la excepción que en este análisis se evalúa el efecto que tiene la combinación de dos fármacos sobre la viabilidad y la proliferación celular en las líneas de TNBC.

Para los ensayos de sinergias, los datos obtenidos de las combinaciones de los compuestos tras en el ensayo MTT se analizaron con el software Calcosyn (Biosoft, Cambridge, Reino Unido) basado en el algoritmo *Chou-Talalay* (Bijnsdorp et al., 2011) para establecer el efecto de la combinación. Este programa da un valor, llamado C.I. (*Combination Index*) que va de 0 a 2 siendo: sinérgico ( $CI < 1$ ), aditivo ( $CI = 1$ ) o antagónico ( $CI > 1$ ).

## 5.6. Estudios moleculares

### 5.6.1. Análisis de la expresión génica: PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa (RT-qPCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que sirve para estudiar la expresión génica tras la amplificación y simultánea cuantificación del material genético, ya sea ADN o ADNc proveniente de ARN. La ventaja frente a una PCR convencional, es que la RT-qPCR permite la cuantificación de las moléculas de ADN amplificadas empleando un marcaje fluorescente (SYBRGREEN). Durante cada ciclo, se mide la fluorescencia y la señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN replicado, por lo cual, el ADN se cuantifica en "tiempo real". El valor que se usa para

valorar la expresión génica lo da el ciclo en el que la señal empieza a detectarse, en el llamado ciclo umbral (Ct, del inglés, *cycle threshold*).

Para cuantificar los niveles de expresión génica lo primero que se hizo fue el aislar el ARN total de todas las muestras, ya hayan sido expuestas al tratamiento con JQ1 (MDA-MB-231 o BT-549 adherentes, cultivos de esferoides y tumores derivados de esferoides de MDA-MB-231 inyectados en ratones balb-nude), o bien expuestas a medio condicionado de CAAT (MDA-MB-231 adherentes) o AdMSC<sup>TNBC</sup> (MDA-MB-231 adherentes). La extracción de ARN se realizó utilizando el “*RNeasy Mini kit* (Qiagen)” siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de seguir con el estudio se determinaron las concentraciones y purzas del ARN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). A continuación, se retrotranscribió 1 µg de ARN total utilizando *RevertAidHMinus First Strand cADN synthesis kit* (Thermo Fisher Scientific) en un termociclador (Bio-Rad) en las siguientes condiciones de reacción: 65°C durante 5 min, 42°C durante 60 min, y 70°C durante 10 min. Los ADNc resultantes se sometieron a un análisis por RT-qPCR utilizando *Fast SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.) en un sistema de PCR en tiempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). Las condiciones utilizadas incluyeron un paso inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y un paso final a 60°C durante 1 min. Cada muestra se analizó por triplicado y se determinaron los valores Ct de las transcripciones utilizando el programa informático *StepOne v.2.1*. Los valores de expresión génica se calcularon utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$  usando como referencia la expresión del gen *GAPDH*, que se usó para normalizar los valores de los genes de estudio. Las muestras no tratadas se utilizaron como controles para determinar los cambios relativos en la expresión del ARN mensajero (ARNm). Las secuencias de cebadores empleadas en la investigación se enumeran en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para realizar la PCR cuantitativa.

<i>Gene</i>	<i>Cebador en sentido de avance</i>	<i>Cebador antisentido</i>
<i>ABCG2</i>	5'-GCTACACCACCTCCTTCTGT-3'	5'-GGAAGAAGAGAACCCCAGCT-3'
<i>ALDH1A1</i>	5'-CCTGGAGCTTGGAGGAAAGA-3'	5'-CTTCTTAGCCCGCTCAACAC-3'
<i>CD10</i>	5'-TGGTCAAGCATAACAGAGCCT-3'	5'-GAAATTGCCTGGACTGTGCA-3'
<i>CD105</i>	5'-CCACTAGCCAGGTCTCGAAG-3'	5'-GATGCAGGAAGACACTGCTG-3'
<i>CD24</i>	5'-GCTCCTACCCACGCAGATTT-3'	5'-TGAGACCACGAAGAGACTGG-3'
<i>CD31</i>	5'-AACAGTGTGACATGAAGAGCC-3'	5'-TGTA AACAGCAGCAGTCATCCTT-3'
<i>CD44</i>	5'-CGCCAAACACCCAAAGAAGA-3'	5'-TTCCTGCTTGATGACCTCGT-3'
<i>CD49</i>	5'-AGTTGGTGGAGAGACTGAGC-3'	5'-GGGAGGAGATGTGCAGACTT-3'
<i>CD73</i>	5'-CAGTACCAGGGCACTATCTGG-3'	5'-AGTGGCCCCTTGCTTTAAT-3'
<i>CD90</i>	5'-ATGAACCTGGCCATCAGCA-3'	5'-GTGTGCTCAGGCACCCC-3'
<i>CDH1</i>	5'-CGACCCAACCCAAGAATCTA-3'	5'-AGGCTGTGCCTCCTACAGA-3'
<i>EPCAM</i>	5'-CATGTGCTGGTGTGTGAACA-3'	5'-CGCGTTGTGATCTCCTTCTG-3'
<i>EZH2</i>	5'-GATGGGAAAGTACACGGGGA-3'	5'-GGTGGGCGGCTTTCTTTATC-3'
<i>FSTL1</i>	5'-GCCTGTGGAAATTGGGTCTG-3'	5'-GGTGCTCACTCTTTGGTCT-3'
<i>GADPH</i>	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3'
<i>GJA1</i>	5'-TACAAGCTGGTACTGGCGA-3'	5'-ATCAAAAGGCTGTGCATGGG-3'
<i>HLA-DR</i>	5'-CACCTATTGCAGACACAA-3'	5'-ACCTTAGGATGGACTCGC-3'
<i>ITGA6</i>	5'-AGTTGGTGGAGAGACTGAGC-3'	5'-GGGAGGAGATGTGCAGACTT-3'
<i>KLF4</i>	5'-AGAGACCGAGGAGTTCAACG-3'	5'-CGGATCGGATAGGTGAAGCT-3'
<i>MYC</i>	5'-ATTCTCTGCTCTCCTCGACG-3'	5'-CTGTGAGGAGGTTTGCTGTG-3'
<i>OCT4</i>	5'-GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA-3'	5'-CGAGGAGTACAGTGCAGTGA-3'
<i>PIAS3</i>	5'-AGGTGGCCACTACAAGTCTC-3'	5'-GGAGCCTTCTGTACACAC-3'
<i>RUNX2</i>	5'-CTGTGGTACTGTCATGGCG-3'	5'-AGGTAGCTACTTGGGGAGGA-3'
<i>SOX2</i>	5'-CGGAAAACCAAGACGCTCAT-3'	5'-TTCATGTGCGGTAACCTGTC-3'
<i>SOX9</i>	5'-TTTCCAAGACACAAACATGA-3'	5'-AAAGTCCAGTTTCTCGTTGA-3'
<i>VIM</i>	5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAG-3'	5'-TCCAGCAGCTTCTGTAGGT-3'

## 5.6.2. Análisis de la expresión y actividad de proteínas

### 5.6.2.1. Obtención de extractos o lisados de proteínas

Para la realización de los estudios moleculares se sembraron células MDA-MB-231 a una densidad de 300.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio DMEM completo. Al día siguiente, se reemplazó el medio completo de las células MDA-MB-231 por el MC de las células AdMSC<sup>TNBC</sup> o HEK293T con el fin de pretratarlas durante al menos 6 horas antes de la exposición a los tratamientos con CDDP (5, 10 $\mu$ M), DOXO (250, 500nM)

y DTX (2.5, 5nM), y dasatinib (250nM, 500nM) en ambas condiciones, dejando sin tratar los controles y las muestras que serán empleadas más adelante en los arrays de RTK.

48 horas más tarde, las células se lavaron 2 veces con PBS (Sigma Aldrich) y, se recogieron en tampón de lisis (140 mM NaCl, 5mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40 y 20 mM Tris (Sigma Aldrich) pH 7.0) en presencia de inhibidores de proteasas (1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina (Thermo Fisher Scientific) y 200 mM PMSF (Sigma Aldrich) e inhibidores de fosfatasa (25mM β-glicerolfosfato, 10 mM NaF, 1mM ortovanadato de sodio (Sigma Aldrich)). Después de 30 minutos de lisis, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000g a 4°C para eliminar los restos celulares insolubles. A continuación, se determinó la concentración de proteínas de los lisados celulares utilizando el *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.6.2.2. Arrays para la evaluación del perfil de activación de proteínas RTK.

Para investigar como afectaba al estado de fosforilación de una amplia selección de RTK y nodos relacionados que las células MDA-MB-231 estuvieran expuestas a los MC que contenían los factores secretados por las células AdMSC<sup>TNBC</sup> y HEK293T se empleó el kit "PathScan RTK Signaling Antibody Array Kit" (#7982, Cell Signaling Technology). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se adicionaron 150 µg del extracto proteico a estudiar (MDA-MB-231 expuesta a AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM y HEK293T-MC durante 48 horas) a las membranas del array que tienen unidos los anticuerpos contra las proteínas a estudiar y se realizaron los pasos siguientes como se encuentra descrito por la casa comercial. Finalmente, el perfil de activación resultante de las diferentes RTK en las membranas se detectó mediante quimioluminiscencia usando el revelador LAS-4000 (Fujifilm). Las imágenes obtenidas se cuantificaron utilizando el software ImageJ (NIH) y se representó como el porcentaje de densidad de píxeles (OD / mm<sup>2</sup>). La densidad de píxeles del fondo se restó a la densidad de píxeles de cada punto y se determinó el promedio de puntos duplicados.

### 5.6.2.3. Ensayos de Western-blot

Para el ensayo de Western-blot, tras determinar la concentración de proteínas que había en el lisado por utilizando el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) descrito en puntos anteriores, se añadió tampón de carga (Laemmli: 200 mM Tris pH 6.8, 40% glicerol, 8% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 2% beta-mercaptoetanol (Sigma Aldrich)) en proporciones de 1 parte de tampón de carga por 5 de la muestra (6x) y estas se hirvieron a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las cantidades de proteína indicadas se corrieron en geles de acrilamida a diferentes porcentajes, en condiciones desnaturalizantes utilizando el tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina (Thermo Fisher Scientific), 0.1% SDS, pH 8.3). Después de la electroforesis (120-150V, 1 hora y media-2 horas), las proteínas de los geles se transfirieron a las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU.) previamente activadas con etanol o metanol puro durante 15 segundos. La transferencia se realizó de forma semiseca aplicando un voltaje constante de 20 V en el tampón de transferencia (25 Mm Tris, 192 mM glicina) a diferentes tiempos según el peso molecular que tienen las proteínas evaluadas.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, estas se incubaron con tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en T-TBS (tampón TBS con 0,1% de Tween 20 (Thermo Fisher Scientific)) en agitación durante una hora. Este paso es necesario para bloquear los sitios de unión inespecíficos a los que podría unirse posteriormente el anticuerpo. Una vez bloqueadas las membranas, se lavaron tres veces (5 minutos cada lavado en un agitador orbital) en tampón T-TBS y a continuación, fueron incubadas con los diferentes anticuerpos contra las proteínas que queremos evaluar o sus formas fosforiladas (Santa Cruz Biotechnology, USA; Cell Signalling, Beverly, MA, USA) en agitación constante, 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Al terminar la incubación, las membranas se lavaron de nuevo tres veces en lavados exhaustivos de 5 minutos en un agitador orbital con tampón T-TBS se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes (1:10.000 anti-conejo o 1:5.000 anti-ratón conjugados con actividad peroxidasa conjugada (GE

Healthcare) en tampón T-TBS. Finalmente, tras otro lavado intensivo (3 veces durante 5 minutos en T-TBS), se procedió a la detección del anticuerpo unido a la proteína de interés (fosforilada o no) mediante quimioluminiscencia con ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Este método consiste en la adición de un sustrato que detecta y reacciona de forma específica con la peroxidasa conjugada unida al anticuerpo secundario (que a su vez se encuentra formando un complejo con el anticuerpo primario y la proteína de interés) de forma que produce una señal detectable mediante el sistema de análisis de imagen LAS-4000 (Fujifilm).

Las imágenes obtenidas se cuantificaron haciendo un análisis densitométrico de las diferentes bandas, utilizando el software gratuito ImageJ (NIH), de esta forma se facilita la estimación de cambios de intensidad presentes en la membrana. Los valores (dados como unidades arbitrarias) se normalizaron considerando los niveles de proteína total de cada muestra. En todos los casos se utilizó un anticuerpo contra calnexina como control de carga.

## 5.7. Evaluación de la capacidad de autorenovación

### 5.7.1. Ensayo de dilución límite

El principio de esta técnica se basa en la realización de diluciones seriadas de una suspensión celular hasta conseguir una alícuota que contenga el número de células que se esperan, normalmente una única célula, de forma que se pueda evaluar la capacidad de autorenovación de las células madre del cáncer.

Para el ensayo de dilución límite, las esferas tumorales primarias (TS) MDA-MB-231 y BT-549, obtenidas de esferoides de 21 días de edad, se recuperaron de las placas no adherentes y se disgregaron mecánicamente hasta formar una suspensión de células individuales. A continuación, se lavaron con PBS y el pellet de células se resuspendió en medio de las células tumorales. Tras su contaje, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de baja adherencia (Corning) realizando diluciones seriadas para conseguir diluciones desde 200

células/pocillo hasta 1 célula/pocillo, en ausencia y presencia de JQ1 (200 nM). La formación de esferoides fue monitorizada mediante el microscopio invertido Nikon Eclipse TS1000 (20X) hasta el día 21, determinando el número de TS secundarias presentes en cada pocillo.

### 5.7.2. Ensayo de formación de tumorosferas secundarias y terciarias.

Para los ensayos de formación de TS secundaria y terciaria, se disociaron mecánicamente las TS primarias de MDA-MB-231 y BT-549, obtenidas a partir de esferoides de 21 días de edad, y se sembraron a razón de 200.000 células en placas de 100 mm de baja adherencia (Falcon), en presencia de JQ1 (200 nM) durante 3 días. A continuación, se determinó el número de TS secundarias resultantes por placa contabilizando a ciegas en 25 campos de visión aleatorios. Las TS secundarias se disociaron de nuevo y se dejaron en presencia de la droga hasta el día 6, en el que se determinó el número de TS terciarias por placa de la misma forma. Las imágenes de TS se tomaron en los dos puntos de tiempo usando un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS1000 (10X).

## 5.8. Ensayo de formación de colonias

### 5.8.1. Evaluación de la capacidad de iniciación tumoral

Este ensayo proporciona información sobre la capacidad celular de iniciación tumoral, es decir, mide la capacidad proliferativa que tiene una única célula para dar lugar a una colonia celular (más de 50 células) en un tiempo determinado.

Para ello, las células MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153, se sembraron a baja densidad (500 células/pocillo) en su medio correspondiente en placas de 6 pocillos. Transcurridas 24h, el medio de cultivo fue reemplazado por el MC obtenido previamente

(HEK293T-MC en tres pocillos y ADMSC<sup>TNBC</sup>-MC en los otros tres) y se incubaron durante 8-10 días, renovando el MC cada 3-4 días.

Pasado este tiempo, se evaluará la capacidad de formar una colonia a partir de una sola célula, tras la fijación (Glutaraldehído 0.5 %, 15 minutos, Sigma Aldrich) y la tinción (0.05% de solución de cristal violeta, 10 minutos, Sigma Aldrich) de las colonias existentes. Por último, las placas se cultivo se escanearon y las imágenes resultantes se emplearon para la cuantificación de las colonias que se llevó a cabo utilizando el *plugin* "Cell counter" del software ImageJ (National Institute Health (NIH)).

### 5.8.2. Evaluación de la capacidad de recurrencia o recidiva tumoral post-tratamiento

Para determinar la capacidad de recurrencia o recidiva que tienen las células después de recibir tratamiento farmacológico *in vitro*, es decir, la capacidad que tienen las células para volver a iniciar el crecimiento tumoral después de haber sufrido un tratamiento con quimioterapia, se adaptó el ensayo anterior (5.8.1). El método se basa en la capacidad de una célula de crecer dentro de una colonia formada por al menos 50 células tras exposición a un fármaco.

Por ello, las líneas celulares de TNBC; MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153 se sembraron por separado en una placa de 100 mm a una densidad de 500.000 células/placa en su medio correspondiente (DMEM o RPMI). Después de 24 horas, las células se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de factores secretados por el ADMSC<sup>TNBC</sup> (HEK293T-MC o ADMSC<sup>TNBC</sup>-MC) antes de ser expuestas durante 24 horas más a los fármacos (5 $\mu$ M CDDP, 200nM DOXO y 1nM DTX) o al inhibidor de SRC dasatinib (250nm, 500nM). Después de este tiempo, se recogieron las células de cada placa mediante tripsinización y se resuspendieron con medio fresco completo (DMEM o RPMI) para proceder al conteo celular utilizando la cámara de Neubauer. De este modo, se



sembraron las células a tres densidades diferentes: 500, 5000 y 50000 células/pocillo, por triplicado en placas de 6 pocillos en su medio y se mantuvieron en cultivo durante 10 días.

Finalmente, tras tinción de las colonias con el método del cristal violeta (ver apartado anterior 5.8.1), se procedió al escaneado de las placas y a la cuantificación de las colonias utilizando el *plugin* "Cell counter" del software ImageJ.

## 5.9. Ensayos de invasión en matrigel

Este tipo de ensayo tiene como objetivo mimetizar un cultivo tridimensional para observar cambios potenciales en la morfología (tamaño de las esferas y número de ramificaciones), supervivencia y crecimiento de esferoides tumorales. De esta forma embebiendo las células en una matriz 3D se puede evaluar tanto el crecimiento y progresión tumoral per se de las células como la posible capacidad metastásica o invasiva que tienen las mismas tras un tratamiento.

### 5.9.1. Evaluación del crecimiento y capacidad de invasión y progresión tumoral

Para evaluar el crecimiento y las capacidades de invasión y progresión tumoral, las células MDA-MB-231 fueron tripsinizadas y resuspendidas, a razón de 25.000 células/ml, en medio de cultivo que contenía un 2% de Matrigel (Sigma Aldrich). A continuación, se depositaron 400µl de esta solución (10.000 células) en una placa de 48 pocillos que contenía un lecho subyacente de aproximadamente 1 mm de espesor de Matrigel y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células embebidas en matrigel se expusieron al HEK293T-MC o al ADMSC<sup>TNBC</sup>-MC durante 3 días. El ensayo incluyó la visualización diaria de células bajo un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS1000 (20X) para monitorizar el fenotipo temporal de estos cultivos en 3D.

### 5.9.2. Evaluación de la capacidad invasiva/metástasis post-tratamiento

Para poder obtener información sobre la adhesión célula-EMC, contacto célula-célula y la capacidad invasiva/metastásica se modificó mínimamente el ensayo anterior (5.9.1). Las

células MDA-MB-231 se sembraron del mismo modo y manteniendo las mismas condiciones. Al día siguiente cuando las células ya estaban embebidas en el matrigel, se incubaron durante 6 horas con el HEK293T-MC o el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC y pasado este tiempo se expusieron durante 3 días a CDDP (5 $\mu$ M), DOXO (200nM), DTX (2,5nM) o DASA (250nM y 500nM). Al igual que en la aproximación anterior, con el fin de ir monitorizando el fenotipo temporal, el ensayo incluyó una visualización diaria de células y toma de imágenes en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS1000 (20X).

Por otro lado, también se evaluó la capacidad invasiva de los esferoides de MDA-MB-231 y BT549 recién disociados de forma mecánica. 10.000 células individuales se sembraron sobre en una fina capa de matrigel en placas de 48 pocillos. Después de la incubación nocturna, las células fueron expuestas a JQ1 (200 nM) durante 3 días. Al igual que los anteriores, las estructuras invasoras en 3D se visualizaron y se fotografiaron diariamente durante tres días bajo un microscopio óptico Nikon Eclipse TS1000 (20x) invertido.

Finalmente, el análisis cuantitativo de todas las imágenes se realizó empleando el software ImageJ.

### 5.10. Ensayos de inmunofluorescencia

La IF es un procedimiento que tiene como fin detectar, amplificar y hacer visible un antígeno específico, que generalmente es una proteína. De este modo, esta técnica nos puede proporcionar información sobre cuales, en que proporciones y donde se encuentran específicamente localizadas nuestras proteínas de interés tras la incubación con anticuerpos unidos a fluoróforos.

Es sabido que las CSC de mama se caracterizan por expresar determinados marcadores que las distinguen de las células diferenciadas, entre ellos CD44, y es por ello por lo que para evaluar como afectaba a la stemness tumoral un tratamiento con JQ1 (200 nM) y OTX-015 (400 nM) en las TS de MDA-MB-231 se empleó esta técnica.

Tras un tratamiento de 72 horas, se recogieron los esferoides flotantes de MDA-MB-231 con una pipeta y se depositaron suavemente sobre un portaobjetos tratado con poli-lisina (DAKO), usando un DAKO pen para evitar la dispersión de la gota. Antes de un minuto, para evitar que las TS pierdan su morfología, se eliminó el exceso de líquido y los esferoides que se habían adherido al portaobjetos se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído (4%). Después de lavar cuidadosamente dos veces con PBS, las muestras se bloquearon con Albúmina de Suero Bovino (BSA) (5%) durante 30 min y, a continuación, se incubaron con Antígeno CD44 acoplado a R-Ficoeritrina (PE) (R&D Systems) durante 60 min (3% BSA). Después de la incubación los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS durante 2 minutos. Tras lavar cuidadosamente con PBS, y se añadió 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (300 nM) (Sigma Aldrich) durante 10 minutos para marcar los núcleos y se volvió a lavar 2 veces con PBS cuidadosamente antes de montar los cubreobjetos con Fluoroshield (Sigma Aldrich, Thermo Fisher Scientific Inc.). Para la visualización los esferoides de MDA-MB-231, se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 710 el cual esta equipado con un objetivo de inmersión en aceite Plan Apo 63x. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 568 nm para CD44 y 405 nm para DAPI.

## 5.11. Citometría de flujo

### 5.11.1. Ciclo celular: tinción del ADN con yoduro de propidio

El ciclo celular es el nombre con el que se conoce el proceso mediante el cual las células se duplican y dan lugar a dos nuevas células hijas idénticas. El ciclo celular lo conforman cuatro fases; G1, S, G2 y M. La fase G1 es aquella en que la célula contiene su material genético completo (2N) y se prepara para dividirse. Para hacerlo, entra en la fase S, que es cuando la célula sintetiza una copia de todo su ADN. Una vez se dispone del ADN duplicado y hay una dotación extra completa del material genético, la célula entra en la fase G2, cuando condensa y organiza el material genético y se prepara para la división celular. Es en este punto cuando la célula contiene su material genético duplicado (4N) y debe pasar a la fase de mitosis, denominada fase M. En esta fase, la célula reparte las dos

copias de su material genético(4N) entre sus dos células hijas dando lugar a dos células idénticas (2N). Una vez acabado el ciclo celular, hasta que se inicie uno nuevo, la célula(2N) se encontrará en un estado inactivado, esta fase se denomina G0.

Por tanto, según la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células, poseen una cantidad diferente de ADN, 2N en las fases G0/G1, 4N en G2/M y una cantidad intermedia para la fase S. Esta diferencia de carga genética celular nos permite identificar mediante el uso de agentes intercalantes del ADN (y ARN) como ioduro de propidio (IP) la señal fluorescente que emiten por citometría de flujo. De esta forma, podemos evaluar qué efecto producen determinados compuestos sobre el ciclo celular atendiendo a la intensidad de la señal que produce. Para el análisis del ciclo celular, se sembraron tumorosferas de MDA-MB-231 (500.000 células) en una placa de 100mm en medio correspondiente suplementado y tras 24 horas, se trataron con JQ1 100 nM y JQ1 200 nM. A las 24 horas de administrar el tratamiento, se recogieron las células en flotación y se centrifugaron a 2000g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se fijó con etanol al 70% en hielo durante 30 minutos y seguidamente, se centrifugó a 2000g durante 5 minutos. Tras eliminar el fijador se lavó el pellet de células con una solución al 2% de BSA con PBS frío, se centrifugaron de nuevo las células (2000 g, 5 minutos, 4°C) y se descartó el sobrenadante. A continuación, se tiñeron las células con una solución de ioduro de propidio/ARNasa (Immunostep, S.L., Salamanca, España) y se incubaron en oscuridad en la noria durante 1 hora a 4°C. Pasado ese tiempo, se analizaron las muestras en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se determinaron enfrentando la cantidad de ADN (determinada por la intensidad de la emisión del IP) y el número de células usando el software FACSDiva.

#### 5.11.2. Muerte celular: incorporación de Anexina V

La muerte celular fue evaluada por citometría de flujo usando Anexina V (AnV). Esta técnica se basa en la especificidad de unión de la proteína AnV a la fosfatidilserina de la membrana celular. En células viables, la membrana está intacta, y la AnV no se puede

unir. Cuando se inicia el proceso de apoptosis, la membrana se altera, exponiendo al fosfolípido a la cara externa de dicha membrana, lo que permite su reconocimiento por parte de la AnV. De este modo, podemos medir la apoptosis celular colocándole un fluoróforo a la AnV, alofocianina (APC), que será detectable por citometría de flujo. En nuestro caso, esta técnica nos permite testar la muerte celular por apoptosis producida por distintos tratamientos y condiciones sobre las células tumorales.

En primer lugar, para evaluar como afecta el tratamiento con el inhibidor de BRD4 sobre la muerte celular, se sembraron TS de MDA-MB-231 (300.000 células). Tras 24h de incubación, las células se trataron con JQ1 (100 y 200 nM). 72 horas después, se recogieron las células, se centrifugaron (900 rpm, 5 min) y se lavaron dos veces con PBS frío antes de teñirlas con 5 ml de la solución AnV/DT-634 (Immunostep S.L., Salamanca, España) en tampón de unión 1x (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaOH, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Las células vivas serán por tanto aquellas que presenten una tinción negativa a la AnV, siendo Anexina + las que se encuentran en estado de muerte celular. Ambas poblaciones (AnV + y AnV -) se determinaron utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

Del mismo modo, para evaluar el efecto de los agentes quimioterápicos y el inhibidor de SRC sobre la muerte celular, se sembraron células TNBC en placas de 6 pocillos (200.000 células/pocillo). Al día siguiente, después de la preincubación con los medios condicionados de HEK293T y AdMSC<sup>TNBC</sup> durante 6 horas excepto los controles, las células fueron expuestas a las drogas (dosis equivalente al IC<sub>50</sub>) CDDP (5, 10 μM), DOXO (250, 500 nM) y DTX (2.5, 5 nM), o al inhibidor DASA (250 nm, 500 nM). Tras 48 horas, se recogieron tanto las células tumorales adheridas a la placa, que se levantaron con tripsina, como las células flotantes en el sobrenadante. El procedimiento seguido a partir de aquí para el marcaje con AnV fue el mismo que el que se utilizó para la evaluación de la muerte celular tras el tratamiento con JQ1.

## 6. Ensayos pre-clínicos *in vivo*

### 6.1. Inhibición de proteínas BET *in vivo*

Para trasladar nuestro modelo tumoral *in vitro* a un contexto más fisiológico, se inyectaron ortotópicamente TS de MDA-MB-231 (2.000.000 células) recién dissociadas en la mama de ratones Balb-nude (hembras, 6 semanas de edad, n = 6/grupo) y se dejaron crecer durante 14 días. Pasado este tiempo, cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 250 mm<sup>3</sup> (Volumen del tumor = (longitud x anchura<sup>2</sup>) /2), los ratones fueron tratados diariamente durante tres días con JQ1 (50 mg/kg, por vía intravenosa). Finalmente, los ratones fueron sacrificados por la inhalación de CO<sub>2</sub>. A continuación, se extrajeron los tumores y se almacenaron criogénicamente (-80°C) hasta que se realizaron los análisis de RT-qPCR (técnica explicada más arriba en el apartado 5.6.1 y la expresión de los genes identificados fue evaluada. Todos los estudios en animales se realizaron según los protocolos aprobados por el comité ético de experimentación animal del Hospital de Albacete (Procedimiento PR-2017-03-07).

### 6.2. Evaluación de la capacidad de iniciación tumoral

Para estudiar la capacidad de iniciación tumoral *in vivo* que tenían las células al establecer una comunicación con el MT, se inyectaron en la línea mamaria de ratones hembra balb-nude (6 semanas de edad, n=4/grupo) 500.000 células de AdMSC<sup>TNBC</sup> o MDA-MB-231 solas o una combinación de ambas (ratio 1:1). Desde el día 7, se fueron tomando medidas de los tumores cada 2-3 días para evaluar la capacidad de iniciación. Tras dos semanas, los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Por último, los tumores se extrajeron, pesaron y almacenaron a -80°C para asegurar su buena conservación para un posterior uso si fuese necesario.

### 6.3. Evaluación *in vivo* de la quimioresistencia producida por los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>

Para evaluar *in vivo* la resistencia a la quimioterapia producida como consecuencia a una preexposición al secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup>, se inyectaron ortotópicamente 2.000.000 células MDA-MB-231 solas o en combinación con 500.000 células de AdMSC<sup>TNBC</sup> (ratio 4:1) en la línea mamaria de ratones hembra Balb-nude (6 semanas de edad, n=3/grupo) y se dejaron crecer durante 2 semanas hasta que el volumen de sus tumores alcanzó 150-250mm<sup>3</sup> aproximadamente. A continuación, los ratones se trataron con CDDP (3mg/kg) cada tres días de forma intraperitoneal durante dos semanas más y fueron monitorizados diariamente. Pasado este tiempo, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Finalmente, los tumores fueron extraídos, pesados y almacenados a -80°C para asegurarnos su buena conservación para su posterior uso si fuese necesario.

### 6.4. Inhibición de SRC

Para dilucidar si la inhibición de SRC amortigua la proliferación tumoral aumentada por los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> en un contexto de MT, al igual que en el punto anterior (5.13.2), se procedió de la misma forma, se inyectaron ortotópicamente 2.000.000 células MDA-MB-231 solas o en combinación con AdMSC<sup>TNBC</sup> en la línea mamaria de ratones hembra Balb-nude (6 semanas de edad, n=3/grupo) y se dejaron crecer hasta que se obtuvo un volumen tumoral de 250mm<sup>3</sup> aproximadamente. Dos semanas después, los ratones se trataron con dasatinib (10mg/kg, vía oral) cada tres días y fueron monitorizados diariamente. Finalmente, tras dos semanas de tratamiento se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Los tumores fueron extraídos, pesados y almacenados a -80°C para asegurarnos su buena conservación para su posterior uso si fuese necesario.

## 7. Estudios *in silico*

### 7.1. Análisis transcriptómicos de expresión génica

Para evaluar el efecto de JQ1 se realizaron los estudios transcriptómicos. Para ello, se procedió a sembrar 500.000 células de MDA-MB-231 en una placa de 100mm que fueron expuestas a un tratamiento con JQ1 (500 nM) durante 12 y 24 h. A continuación, se aisló el ARN utilizando el kit comercial RNeasy Mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron expuestas a un tratamiento con ADNsa para eliminar el posible ADN genómico contaminante en las muestras de ARN. Una vez aislado el ARN por triplicado las muestras se enviaron al servicio de genómica del Centro del Cáncer de Salamanca, donde se analizó la expresión génica de nuestra muestra usando la plataforma de Affymetrix: *Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0*. Los archivos CEL obtenidos por el procesamiento de la muestra fueron descargados y analizados con el software *Transcriptome Analysis Console 3.0 (TAC)* (Affymetrix) para evaluar las diferencias de expresión génica entre la muestra de MDA-MB-231 que había sido expuesta al tratamiento con el inhibidor de BRD4 (JQ1) y la muestra control.

### 7.2. Análisis de enriquecimiento funcional de un conjunto de genes

#### 7.3. David

Para identificar las funciones celulares alteradas por el tratamiento de JQ1, los genes expresados diferencialmente se analizaron utilizando *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), una herramienta para realizar análisis de enriquecimiento del conjunto de genes. Se ajustó un p-valor < 0,05 para seleccionar los cinco conjuntos de genes enriquecidos de mayor rango.

#### 7.4. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Se clasificaron los genes desregulados según su participación en una amplia gama de funciones celulares utilizando el software GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). GSEA comparara los transcritos de la muestra con un panel de genes que viene predefinido asociado a la función de estudio,



denominado *gene set*, y al mismo los genes que coinciden los clasifica en base a su expresión diferencial. Del mismo modo, esta herramienta calcula una puntuación de enriquecimiento funcional normalizado (NES, del inglés *Normalized Enrichment Score*), que nos permite observar como de alterada se encuentra la función tras el tratamiento (JQ1) respecto al control. Cuando el NES es positivo indica que más fuerte es la posibilidad de que esta función este más alterada tras el tratamiento y menos en el control, y por tanto habrá un menor numero de transcritos de la muestra que coincidan con el *gene set* en el tratamiento con JQ1 en comparación con la muestra control. Esto sería al revés si el NES fuese negativo.

Entre las funciones potencialmente afectadas, se buscaron aquellas relacionadas con la stemness tumoral. Esto incluyó todos los conjuntos de genes que contienen las palabras "diferenciación" o "stem". Finalmente, la lista de transcritos de genes desregulados por el JQ1 resultante se examinó para identificar todos los posibles genes relacionados con el mantenimiento de la stemness tumoral.

### 7.5. Búsqueda de inhibidores selectivos

Inicialmente utilizamos la Base de Datos de Interacción Genética entre Drogas (*Drug Gene Interaction data base (DGIdb)*, <http://www.dgldb.org/>) para identificar los compuestos inhibidores que tenían su diana en *SRC*. Esta pagina web recoge información de artículos científicos, múltiples bases de datos y diferentes recursos web sobre las interacciones de determinados compuestos con determinados genes. En ella podemos buscar agentes que interaccionan de forma selectiva con una lista de genes definidos o qué genes son los que se encuentran afectados por un compuesto que queramos estudiar.

Además, para corroborar nuestros resultados, realizamos búsquedas complementarias en otras paginas web, como Genecards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)), que contiene información de varias bases de datos, o en paginas web de casa comerciales de compuestos Selleckchem (<https://www.selleckchem.com>) y MedchemExpress (<https://www.medchemexpress.com>).

## 7.6. Redes de interacción proteína-proteína

Para construir los mapas de interacción proteína-proteína (PPI) se utilizó la herramienta online gratuita STRING (<http://www.string-db.org>). Esta herramienta nos permitió realizar dos aproximaciones. La primera de ellas, construir la red de interacción de los genes desregulados por el tratamiento con JQ1 relacionados con firma stemness (STRING v10, datos consultados: 14/03/18). La segunda, diseñar la red de interacción proteína-proteína de aquellos genes que se encontraban amplificados ( $FC \leq 2$ ) tras la exposición a los factores contenidos en el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC (STRING versión 11.0, datos consultados: 19/12/19).

En ambas aproximaciones, tras introducir los genes amplificados en la plataforma, analizamos los siguientes parámetros para evaluar el grado de PPI de nuestra red:

- Grado medio del nodo: número medio de interacciones entre las proteínas (nodos) y la red.
- Coeficiente de agrupación: indica la tendencia de la red a formar agrupaciones. Cuanto más se aproxime el coeficiente de agrupación local a 1, más probable es que la red forme agrupaciones.
- p-valor: indica la significación estadística del PPI.

## 7.7. Estudios de progresión clínica de pacientes: Curvas Kaplan-Meier

La herramienta online de libre acceso Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) se utilizó para analizar las relaciones entre la expresión de los genes desregulados por JQ1 relacionados con la stemness y el resultado clínico de los pacientes de TNBC para la supervivencia libre de recaída (RFS). Esta web evalúa el efecto de 54.675 genes en la supervivencia, utilizando 5.143 muestras de cáncer de mama. Una vez seleccionados los parámetros, analiza las muestras de los pacientes que los cumplen y nos proporciona curvas Kaplan Meier (KM) que comparan la relación existente entre la expresión de los genes seleccionados (biomarcador) y el resultado clínico de los pacientes para la RFS, determinando por tanto el pronóstico de la enfermedad. Las curvas resultantes que nos proporciona la herramienta se compararon usando el test de log-rank, y se

complementaron con el ajuste de modelos de regresión de Cox, permitiendo la estimación de ratios de riesgo (Hazard ratios) que mantengan un intervalo de confianza del 95%.

Para el análisis, los pacientes fueron separados según los mejores valores de corte (rango de expresión de la firma = 170 - 11816), y se utilizaron las siguientes sondas:

*Tabla 3. Sondas utilizadas para el análisis de la supervivencia libre de recaída (RFS) de los pacientes con TNBC.*

Gen	Sonda
<i>ABCG2</i>	209735_at
<i>ALDH1A1</i>	212224_at
<i>CD24</i>	266_s_at
<i>CD44</i>	212063_at
<i>EPCAM</i>	201839_s_at
<i>EZH2</i>	203358_s_at
<i>FSTL1</i>	208782_at
<i>GJA1</i>	201667_at
<i>ITGA6</i>	201656_at
<i>MYC</i>	202431_s_at
<i>PIAS3</i>	203035_s_at
<i>RUNX2</i>	232231_at
<i>SOX9</i>	202936_s_at

En el análisis posterior sólo se utilizaron los genes desregulados que se asocian de manera significativa con un peor pronóstico (Hazard Ratio (HR) > 1 y valor  $p \leq 0.05$ ) (*EPCAM*, *SOX9*, *GJA1*, *CD24*). Esta herramienta también se utilizó para determinar la RFS en análisis combinados de los cuatro genes de mal pronóstico.

### 7.8. Estudios de respuesta al tratamiento: Curvas ROC

Para determinar si un biomarcador específico nos puede predecir el beneficio de un tratamiento (terapia endocrina, terapia anti-HER2, quimioterapia) sobre otro empleamos la herramienta online ROC-plotter (<http://www.rocplot.org/>). Esta herramienta es capaz de vincular la expresión génica y la respuesta a la terapia utilizando datos a nivel de transcriptoma de 3.104 pacientes con cáncer de mama.

En nuestro caso, al tratarse del subtipo de TNBC, nos centramos en determinar si un biomarcador nos puede predecir un beneficio en la RFS para los distintos tratamientos quimioterápicos que contempla (antraciclinas, taxanos y/o cualquier tratamiento quimioterápico). De esta forma, se evaluó la relación existente entre los genes de stemness desregulados por JQ1 y el resultado clínico (RFS) post-tratamiento en relación con el régimen de quimioterapia seguido.

## 8. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados, el primer paso fue comprobar si los datos seguían una distribución normal mediante la prueba Komogorow-Smirnow. En los casos de comparación de dos muestras poblacionales independientes, se aplicó la prueba t-Student si dichas pruebas seguían una distribución normal, confirmando además la homogeneidad de la distribución de las varianzas mediante la prueba de Levene. El nivel de significación se consideró del 95%, por lo tanto, los p-valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Se utilizó el software Microsoft Excel versión 16 y el Prisma Graphpad 7.0. A menos que se indique lo contrario, todos los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado.

## 9. Diseño gráfico

Todos los dibujos esquemáticos de esta tesis doctoral fueron realizados por Miriam Nuncia Cantarero utilizando el software online BioRender (<https://biorender.com/>) y mediante Procreate.

# 6

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PARTE 1

Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.

HIPATIA DE ALEJANDRÍA



## 6. Resultados y discusión, parte 1: Identificación de un panel de genes relacionados con la *stemness* asociado con la inhibición de BET en cáncer de mama triple negativo

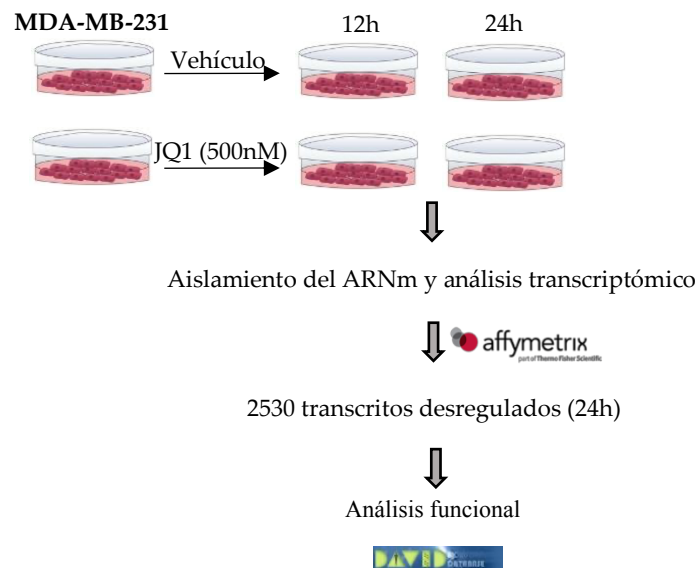
### 6.1. JQ1 altera la expresión de genes relacionados con la *stemness* tumoral

Como se ha mencionado en la introducción, los tumores TNBC carecen de dianas terapéuticas específicas para su tratamiento, lo que hace que éste se limite a radioterapia y quimioterapia estándar, tanto de forma individual como combinada. Además, es común entre estos pacientes desarrollar resistencia a los agentes quimioterápicos, lo que conlleva que dejen de responder al tratamiento y el tumor vuelva a aparecer pasado un tiempo. Existe, por tanto, la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas en TNBC no solo dirigidas a la masa tumoral sino también hacia los principales responsables de esas resistencias, las CSC y el microambiente tumoral. En el caso concreto de las CSC, esta población promueve la adquisición de resistencia potenciando las propiedades *stemness* del tumor. Por tanto, la inhibición de estas propiedades podría dar lugar a tumores menos agresivos, pudiendo llegar incluso a revertir la resistencia a los agentes quimioterápicos.

Hoy en día sabemos que, a través de un programa epigenético desregulado, los tumores pueden aumentar el número de CSC, lo que sugiere que la maquinaria epigenética es esencial para el mantenimiento de la identidad de las células madre y, por tanto, el mantenimiento de la *stemness* tumoral. En consecuencia, controlar los mecanismos relacionados con la epigenética podría ser una estrategia prometedora para inhibir no solo esta subpoblación de células cancerosas (Wainwright & Scaffidi, 2017), sino también las propiedades *stemness* del tumor. En esta parte de la tesis pretendemos evaluar precisamente la importancia de algunos efectores epigenéticos en el mantenimiento de la *stemness* en TNBC. En concreto, queremos ahondar en el papel de la familia de proteínas BET, y más específicamente en la importancia de uno de los miembros de esta familia,

BRD4, que recientemente ha surgido como nueva diana terapéutica no solo en cáncer, sino para las enfermedades metabólicas e inflamatorias (Malta et al., 2018; Nieto-Jiménez et al., 2017; Sahai et al., 2016). BRD4 se encuentra altamente sobreexpresado en cáncer de mama en comparación con tejido mamario normal (Lu et al., 2020).

Con esta idea en la mente, nuestro primer objetivo fue dilucidar si la inhibición de BRD4 puede modificar las funciones relacionadas con la *stemness* en TNBC. Para ello se realizó un análisis transcriptómico en células de TNBC tratadas con el inhibidor de proteínas BET JQ1. Con este fin, células MDA-MB-231 fueron expuestas a JQ1 (500nM) durante 12 o 24 horas. A continuación, se llevó a cabo el análisis de perfiles de expresión de ARNm empleando la consola de *Affymetrix Transcriptome Array 2.0*. Como resultado, se encontraron en total 4652 y 2530 transcritos desregulados en respuesta al inhibidor, a 12 y 24 horas respectivamente (*Figura 12*).



**Figura 12:** Esquema de trabajo para la identificación de genes relacionados con *stemness* controlados por JQ1.



A continuación, para ver en qué funciones se encontraban implicados los genes identificados como desregulados, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional usando la base de datos “DAVID bioinformatics” (<https://david-d.ncifcrf.gov>), que proporciona un conjunto de herramientas de anotación funcional para comprender el significado biológico que pueden aportar un conjunto de genes. De esta manera, se clasificaron los genes en diferentes grupos funcionales atendiendo a los procesos biológicos en los que están implicados. Entre las funciones desreguladas tras el tratamiento con JQ1 destacaron cinco: regulación de la diferenciación celular, regulación de la proliferación celular, localización celular, regulación de la muerte celular, y respuesta al estrés (Figura 13).

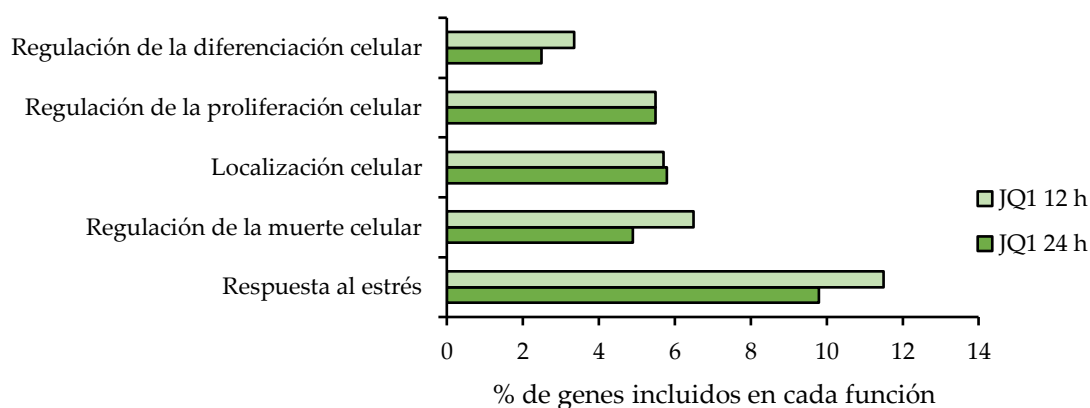
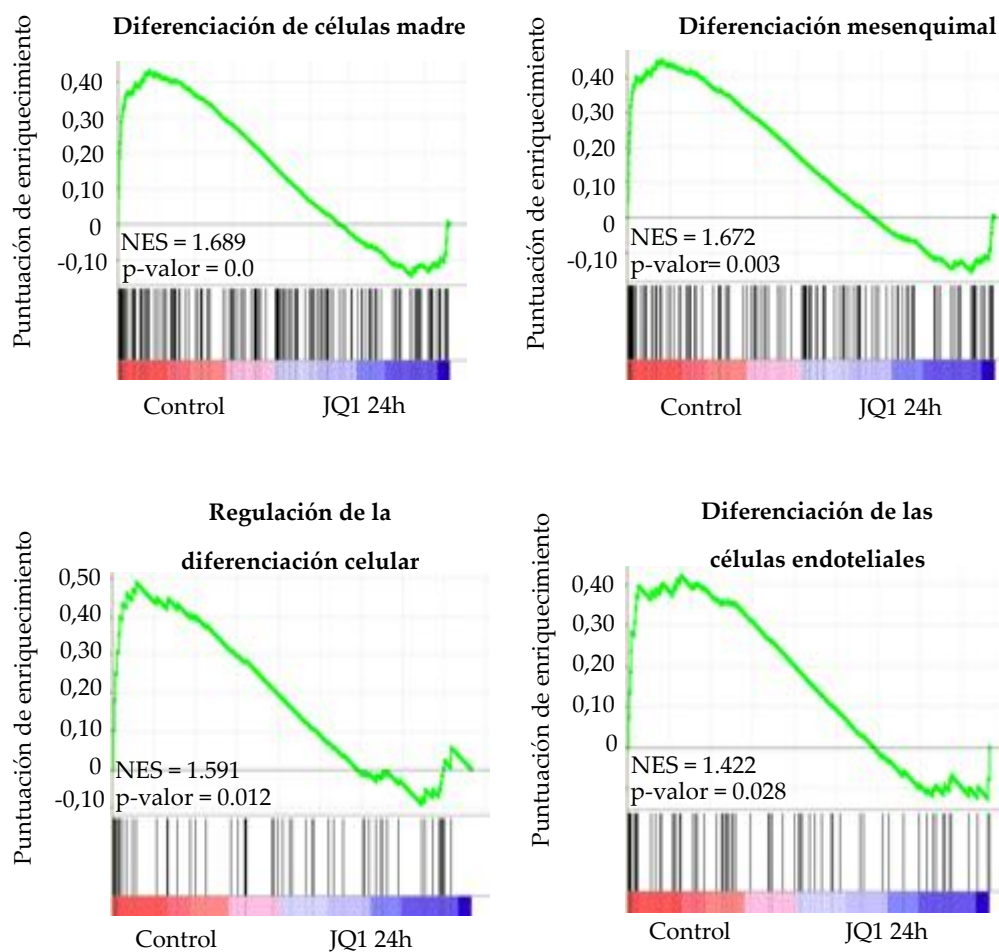


Figura 13: Análisis de enriquecimiento funcional en células MDA-MB-231 después de la incubación con JQ1 (500 nM) durante 12 y 24 h utilizando el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes y los recursos bioinformáticos de DAVID 6.7.

De entre las funciones más enriquecidas, la función que más nos llamó la atención por su relación directa con la *stemness* celular fue la función de regulación de la diferenciación celular. Debido a que las CSC se encuentran en un estado indiferenciado, propio de las células multipotentes, decidimos centrarnos en evaluar si las funciones relacionadas con la diferenciación celular se encontraban enriquecidas o disminuidas tras el tratamiento con JQ1 frente al control. Con este propósito, empleamos el software GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*), que nos permite definir de forma específica la función que nos

interesa estudiar y al mismo tiempo clasificar los genes que hay en mi muestra en base a su expresión diferencial si se encuentran dentro de la misma. Esto lo hace gracias a la comparación de los transcritos de la muestra con un panel de genes que viene predefinido asociado a la función de estudio, denominado *gene set*. Además, gracias a la puntuación de enriquecimiento funcional normalizado (NES, del inglés *Normalized Enrichment Score*), podemos observar como de alterada se encuentra la función respecto al control. De esta forma podríamos concluir que si la función de estudio se encuentra alterada o no en presencia del tratamiento.

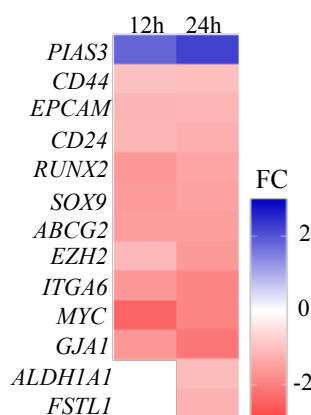
Se estudiaron diversas funciones relacionadas con la diferenciación celular, como diferenciación de células madre, diferenciación mesenquimal, regulación de la diferenciación celular y diferenciación de células endoteliales, entre otras. El valor positivo del NES obtenido del análisis de todas estas funciones revela una gran alteración en presencia del tratamiento con JQ1, lo que queda reflejado en un marcado cambio de expresión en genes implicados en las mismas (*Figura 14*). Asimismo, cabe destacar que la función que presenta una mayor puntuación de enriquecimiento funcional normalizado, por tanto, esta afectada con más certeza, es la diferenciación de células madre (NES=1.689). Como hemos comentado tanto en la introducción como al principio de esta sección, una de las causas de la adquisición de resistencia a los tratamientos viene dada por las propiedades *stemness* del tumor, de las que las CSC son principales efectoras. Detectar que genes se encontraban desregulados en las funciones de *stemness* es el primer paso a la hora de detectar una posible diana terapéutica para atacar la identidad “*stem*” en TNBC.



**Figura 14:** Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos Genéticos (GSEA) que identifica las funciones biológicas relacionadas con la diferenciación celular.

A continuación, se examinó toda la lista de genes desregulados para identificar aquellos genes directamente implicados en el mantenimiento de la *stemness*. Esta búsqueda manual llevó a la identificación de un panel de 13 genes relacionados con la *stemness* y desregulados en respuesta a JQ1: *PIAS3*, *CD44*, *EPCAM*, *CD24*, *RUNX2*, *SOX9*, *ABCG2*, *EZH2*, *ITGA6*, *MYC*, *GJA1*, *ALDH1A1* y *FSTL1* (Figura 15). La mayoría de ellos, relacionados con el mantenimiento de la *stemness*, se encontraban disminuidos en

presencia de JQ1. Sin embargo, *PIAS3*, que es un represor de la vía de señalización de STAT3, y, por tanto, un represor de *stemness*, se encontraba sobreexpresado.

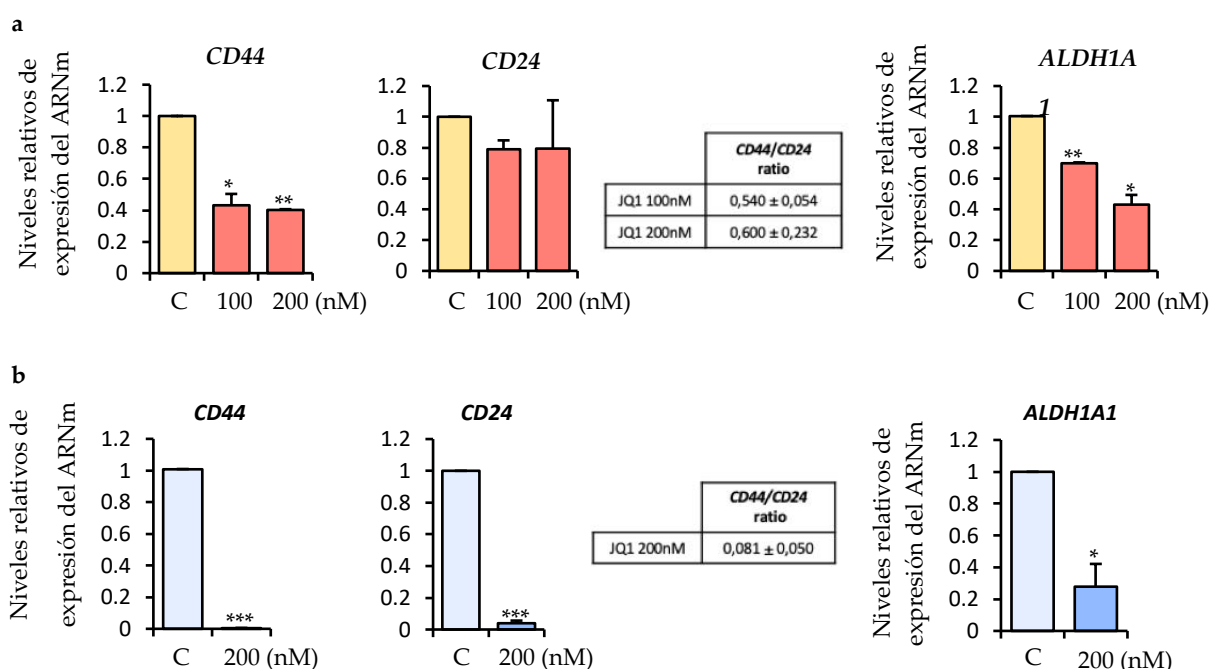


**Figura 15:** Lista de los 13 genes relacionados con la *stemness* identificados mediante exploración manual. Mapa de calor que indica el cambio de expresión (FC, del inglés fold change) de los genes desregulados en MDA-MB-231 por JQ1 tras un tratamiento a 12 y 24 horas en comparación con los de las células no tratadas (incubadas con vehículo).

Para confirmar los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico inicial, se analizaron mediante qRT-PCR todos los genes identificados.

En un primer paso, evaluamos en MDA-MB-231, la línea celular usada para el análisis inicial, el efecto del JQ1 sobre tres de los marcadores de *stemness* más ampliamente estudiados en cáncer de mama, como son *CD44*, *CD24* y *ALDH1* (Ginestier et al., 2007; Li et al., 2017, p. 1; Lin et al., 2016). Tanto la ratio *CD44/CD24* como *ALDH1* son buenos indicadores de malignidad tumoral; en cambio desempeñan funciones diferentes durante el proceso tumoral. Mientras la alta proporción *CD44/CD24* está más vinculada con la proliferación celular y la tumorigénesis, el biomarcador *ALDH1* es un indicador más potente para la migración y la metástasis tumoral (Li et al., 2017).

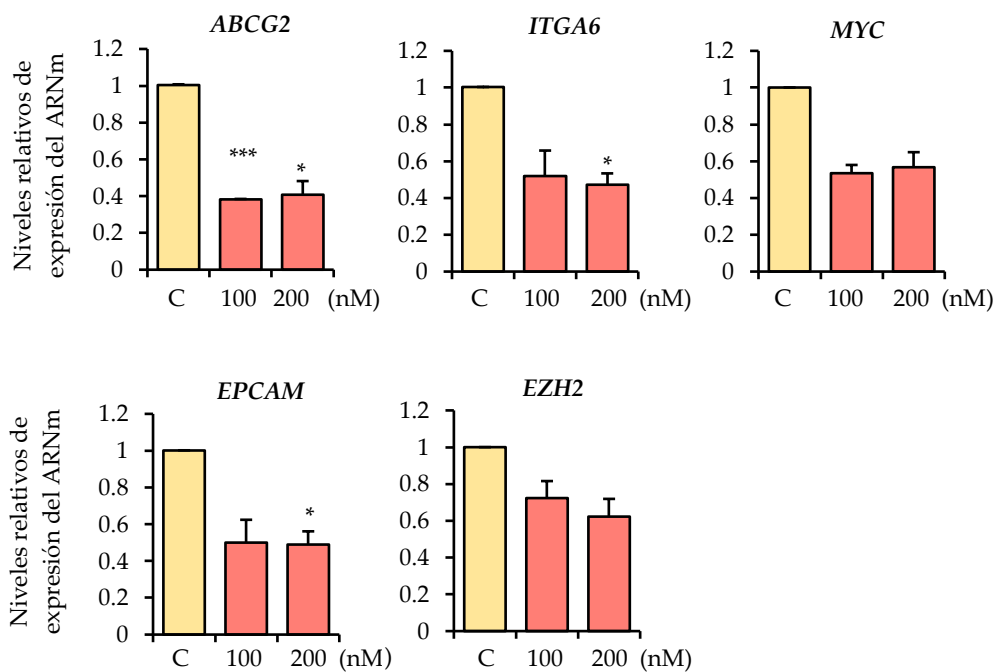
Tras analizar los resultados obtenidos en la qRT-PCR para los dos primeros marcadores, observamos como el tratamiento con JQ1 disminuía los niveles de expresión relativa de ARNm de ambos genes, aunque afectaba en mayor medida a *CD44*. Por tanto, al calcular la ratio *CD44/CD24*, se observó una disminución de esta de casi el 50% en respuesta a JQ1. Por otro lado, también confirmamos la disminución significativa de los niveles de *ALDH1* tras exposición al fármaco en esta línea celular (Figura 16A). Para aportar más solidez a nuestros resultados, estos resultados fueron validados en otra línea celular de TNBC, como son las BT549, en la que también se observó una represión de la expresión de los tres genes y de la ratio *CD44/CD24* tras exposición a JQ1 (Figura 16B).



**Figura 16:** El efecto de JQ1 en los niveles de ARNm de los genes relacionados con la *stemness* identificados corroborado por qRT-PCR. Las células MDA-MB-231 (a) o BT549 (b) fueron tratadas con las dosis indicadas de JQ1 (24 h) después de lo cual se realizó qRT-PCR para los genes indicados. (a y b) Los niveles de ARNm de *CD44* y *CD24* se utilizaron para calcular la proporción de *CD44/CD24* en las células expuestas de JQ1 en comparación con las células de control. Los niveles de ARNm de *ALDH1A1* se redujeron significativamente en las células tratadas con JQ1 en ambas dosis. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

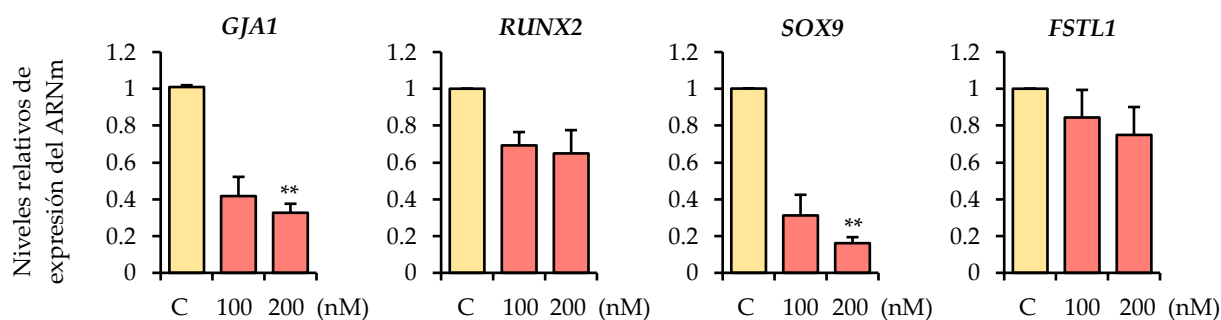
Del mismo modo, también se confirmó por qRT-PCR la disminución en la expresión de cinco genes identificados anteriormente en el array, *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC*, *EPCAM* y *EZH2*, que están involucrados en la iniciación y el mantenimiento de la *stemness* tumoral y la resistencia a la quimioterapia (Figura 17). Concretamente, *ABCG2* es un biomarcador

asociado con la resistencia a la quimioterapia (Mao & Unadkat, 2015); *ITGA6* enriquece la actividad de las células madre del cáncer y promueve la invasión (Brooks et al., 2016); *MYC* es el principal factor de regulación en el mantenimiento de las células madre y la proliferación de células tumorales (Yin et al., 2017); *EPCAM* esta relacionado con el aumento de la proliferación, migración y capacidad invasiva y por tanto, metastásica (Hiraga et al., 2016; Munz et al., 2009); y *EZH2* es un biomarcador que se requiere para el mantenimiento de células madre del cáncer de mama, promueve la oncogénesis y que se puede utilizar como un indicador funcional de células madre del cáncer (van Vlerken et al., 2013, p. 2). Con lo que una disminución de la expresión de estos cinco genes es indicativa de una disminución de las propiedades *stem* de las células tumorales lo cual las podría hacer más sensibles a la quimioterapia, menos agresivas, y por tanto mejorar el pronóstico de los pacientes y reducir las recidivas producidas por la resistencia adquirida a la quimioterapia.



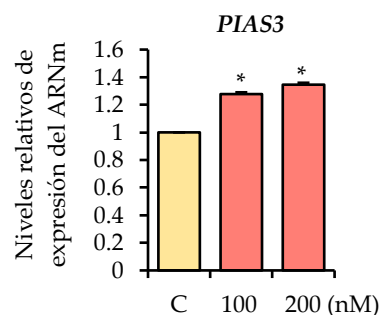
**Figura 17:** JQ1 disminuyó significativamente los niveles de *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC* y *EPCAM* en las células MDA-MB-231, y afectó modestamente el nivel de *EZH2*. Los resultados mostrados son promedios de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

En un siguiente paso, corroboramos por qRT-PCR el impacto de JQ1 sobre la expresión del resto de genes identificados en el examen manual como asociados la stemness, *GJA1*, *RUNX2*, *SOX9* y *FSTL1* (Figura 18). Los resultados obtenidos confirmaron la disminución de estos genes en las MDA-MB-231 tras exposición a JQ1. *GJA1* esta asociado con la proliferación tumoral (Busby et al., 2018, p. 1); *RUNX2* promueve la supervivencia celular bajo estrés metabólico y regula la progresión del cáncer de mama (Tandon et al., 2018, p. 2). *SOX9* induce la formación de tumores y la metástasis en modelos *in vivo* (Voronkova et al., 2017); y *FSTL1*, es un biomarcador relacionado con la stemness que promueve la quimioresistencia, la proliferación tumoral (Cheng et al., 2019, p. 1) y la metástasis (Lau et al., 2017). Con lo que el tratamiento con JQ1 estaría reduciendo la proliferación tumoral y la metástasis, características claves de la *stemness* tumoral. Con este resultado, no solo confirmamos los resultados del estudio transcriptómico inicial, sino que se confirma que todos los genes identificados en el cribado del array como regulados a la baja pueden ser controlados por JQ1 incluso a dosis más bajas (100 y 200 nM) del fármaco.



**Figura 18:** JQ1 disminuyó la expresión relativa de mRNA de *GJA1*, *RUNX2*, *SOX9*, *FSTL1*. Los niveles de ARNm de *GJA1*, *RUNX2* y *SOX9* fueron significativamente alterados por JQ1, mientras que sólo se encontró una ligera disminución para *FSTL1*. Las condiciones de la qRT-PCR se describen en el material y los métodos. Los resultados mostrados son promedios de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

Para completar este set de experimentos, y terminar de validar los resultados del array, se evaluaron los niveles del represor de la *stemness* *PIAS3*. Los niveles de expresión de este gen, al contrario que los del resto de genes del panel identificados, todos ellos con un papel en el mantenimiento de la *stemness*, mostraron un aumento de la expresión en respuesta al iBET en el estudio transcriptómico. Los resultados del estudio de qRT-PCR demostraron que la exposición a JQ1 provoca un aumento de expresión de este gen, confirmando lo observado en el array (Figura 19). Como se ha mencionado en la introducción, un aumento de la expresión de este gen podría inhibir el crecimiento invasivo de los organoides derivados de células de cáncer de mama (Chandhoke et al., 2017) desencadenando por tanto una disminución de las propiedades *stemness* invasivas de los tumores.



**Figura 19:** Aumento de los niveles de RNAm de *PIAS3* tras el tratamiento con JQ1 (100 y 200nM). Las condiciones de la qRT-PCR se describen en el material y los métodos. El resultado mostrado es el promedio de 3 experimentos independientes realizado por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

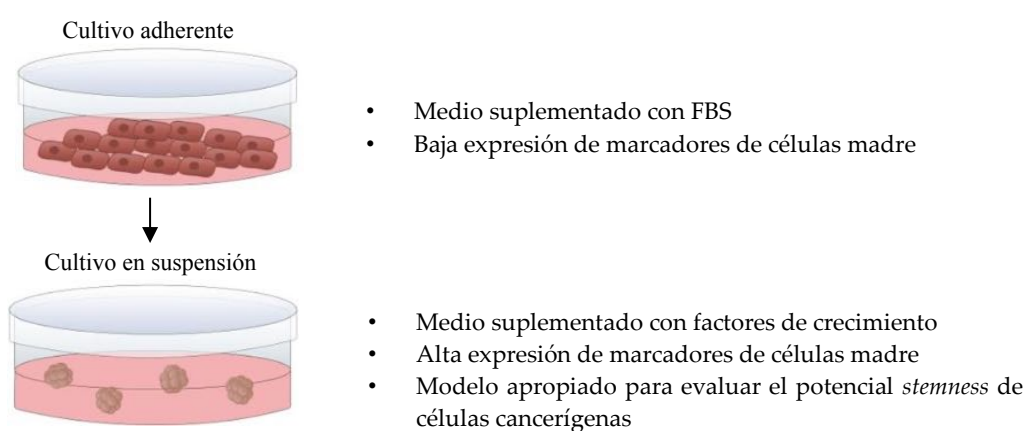
Estos datos confirman el impacto de JQ1, incluso a dosis inferiores de las usadas en el estudio transcriptómico, sobre la *stemness* tumoral a través de la desregulación de un panel de genes asociados a esta propiedad, *CD44*, *CD24*, *ALDH1*, *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC*, *EPCAM*, *EZH2*, *GJA1*, *SOX9*, *FSTL1* y *PIAS3*.



## 6.2. La inhibición de BDR4 afecta a las características de células madre en tumorosferas en TNBC

Se ha demostrado con anterioridad a este trabajo que los modelos tridimensionales de cultivo celular, o tumorosferas (TS), son útiles para la investigación en cáncer (Djomehri et al., 2019; Galan-Moya et al., 2011, 2014; Nieto-Jiménez et al., 2017). Estos modelos reproducen de forma *in vitro* una situación más cercana a la realidad, con lo que los resultados obtenidos recopilan mejor las propiedades fisiológicas del comportamiento del tumor *in vivo* y nos pueden aportar una visión más precisa de lo que podría suceder en los pacientes. Por ello, el uso de líneas celulares inmortalizadas, en monocapa, de manera exclusiva ha comenzado a quedarse obsoleto, siendo una necesidad generar modelos tumorales más complejos que tengan en cuenta todos los factores que afectan a los tumores como el MT, la heterogeneidad intratumoral y la variabilidad de cada paciente, que podrían interferir en el resultado obtenido en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (Niu & Wang, 2015).

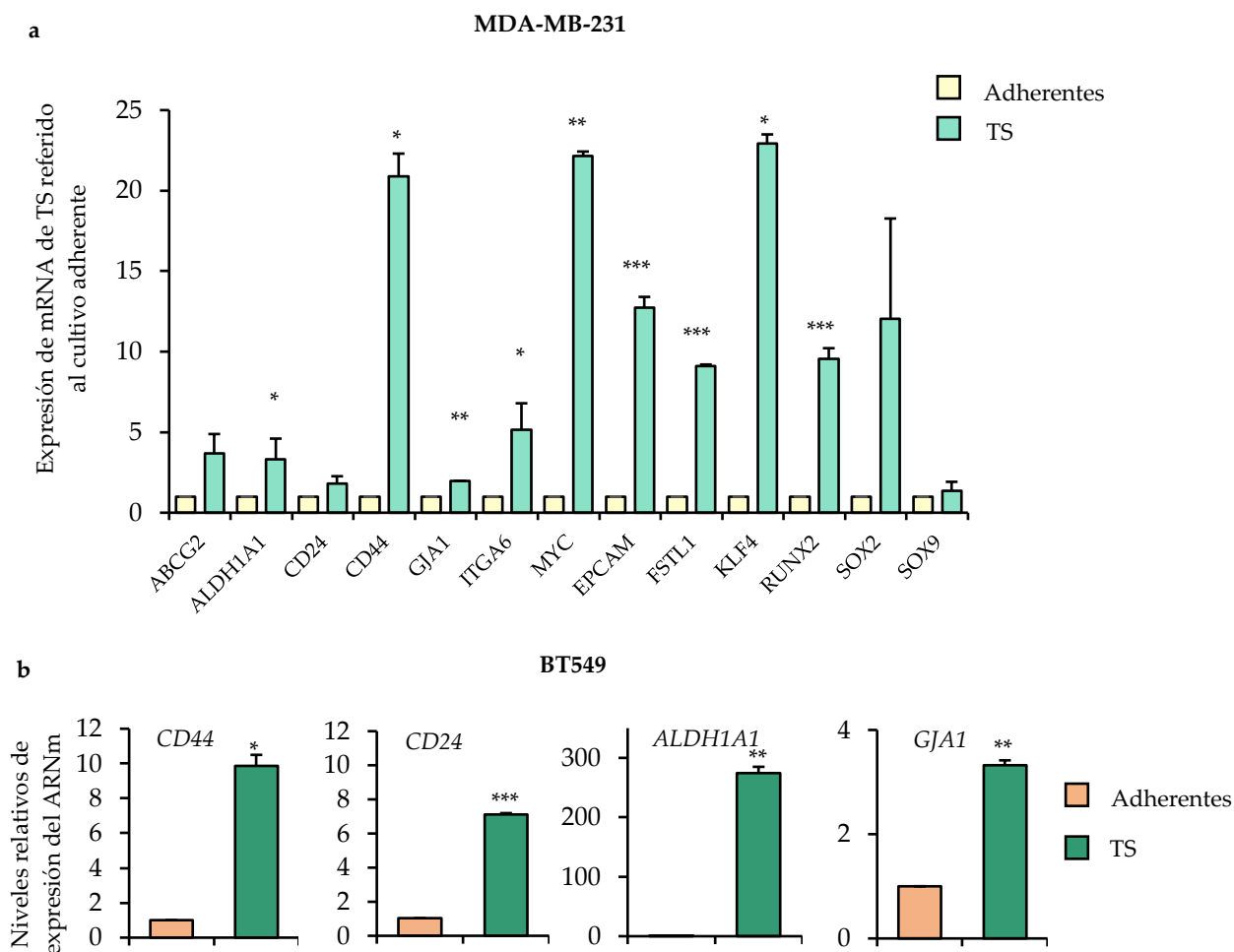
Como regla general, los cultivos celulares 3D en suspensión, desarrollados bajo condiciones específicas, conllevan un enriquecimiento en marcadores de células madre en las TS (Djomehri et al., 2019; Galan-Moya et al., 2011, 2014; Nieto-Jiménez et al., 2017), lo que los convierte en un buen modelo para explorar los efectos de la inhibición BET en las funciones *stemness* (Figura 20).



**Figura 20:** Diferencias entre los cultivos de células adherentes y los cultivos en suspensión de tumorosferas. Las tumorosferas son un buen modelo para evaluar la inhibición de BET en *stemness*, ya que se enriquecen de marcadores de células madre.

En un primer paso, para confirmar este enriquecimiento y, por tanto, que se pueden emplear los modelos de esferoides derivados de líneas celulares TNBC como modelos *in vitro* para el estudio de las CSC en este tipo tumoral, se comparó la expresión relativa de ARNm basal del panel de 13 genes identificados en el análisis transcriptómico y relacionados con la *stemness* en células MDA-MB-231 creciendo como TS respecto las células adherentes parentales. Los resultados de la qRT-PCR revelaron un notable incremento en los niveles de ARNm de los genes marcadores de *stemness* identificados en el apartado anterior en los cultivos de TS frente a los cultivos adherentes de MDA-MB-231 (*Figura 21a*). La ratio *CD44/CD24* en el modelo de TS MDA-MB-231 se incrementó 10 veces respecto al modelo de células adherentes (ratio *CD44 / CD24* relativo= 11.48), confirmando el enriquecimiento de marcadores de *stemness* en el cultivo 3D frente al monocapa y su clara ventaja para el estudio de la malignidad tumoral. En paralelo, evaluamos otros dos marcadores de CSC bien conocidos, como son *SOX2*, asociado con la progresión del cáncer mediante la promoción de la migración, la invasión y la proliferación de células cancerosas así como la metástasis, y *KLF4*, un importante iniciador de carcinogénesis (Novak et al., 2019, p. 2). Tras comparar la expresión relativa de los genes, se comprobó que ambos se encontraban también enriquecidos en el modelo de esferoides de MDA-MB-231.

La sobreexpresión de una selección de estos genes fue también confirmada en un modelo de TS derivado de BT-549 (*Figura 21b*). Al igual que en el modelo de TS MDA-MB-231, la ratio *CD44/CD24* se incrementó en el modelo de TS BT-549, aunque en menor medida (ratio *CD44 / CD24* relativa = 1.38). Sin embargo, la expresión de *ALDH1A* se incrementó de manera más pronunciada en este modelo 3D que en el de MDA-MB-231, siendo los niveles de expresión de mRNA relativos casi 275 veces mayores en el modelo de TS que en el adherente.

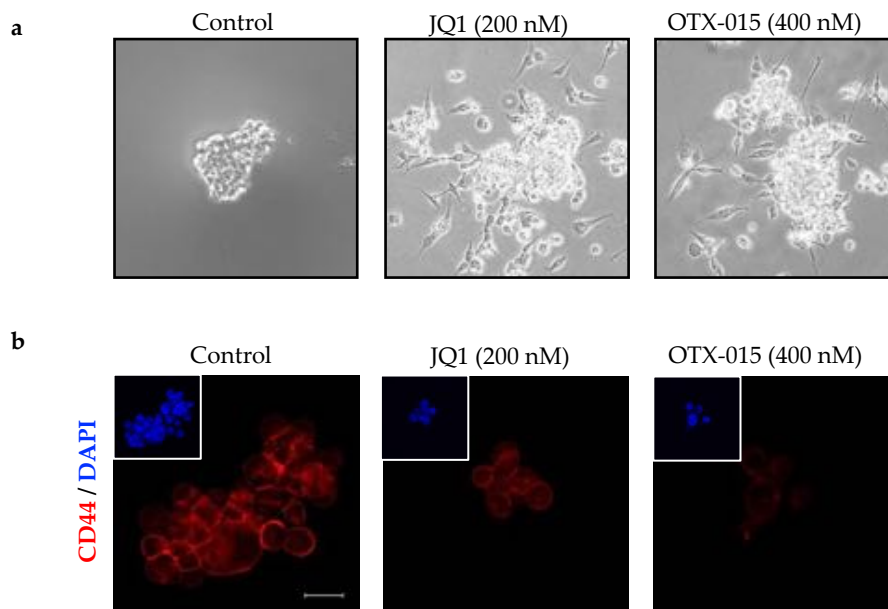


**Figura 21: Validación del modelo celular de tumorosferas.** a. Niveles relativos de expresión de ARNm de varios marcadores de CSC en el modelo de MDA-MB-231TS (verde) comparados con los de los cultivos adherentes (amarillo claro). b. Niveles relativos de expresión de ARNm de CD44, CD24, ALDH1A1 y GJA1 en el modelo de BT-549TS (verde oscuro) comparados con los de los cultivos adherentes (naranja). Los resultados mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

Una vez validados ambos modelos como buenos modelos de CSC, se estudió la influencia de JQ1 en el mantenimiento de la integridad de las TS. Para ello, lo primero que hicimos fue evaluar la capacidad que tenían las TS de crecer en suspensión tras exponerse al JQ1. Como se muestra en la *Figura 11A*, la exposición de las TS derivadas de MDA-MB-231 a JQ1 provocó la pérdida de la capacidad de crecimiento en suspensión, lo que condujo a la adherencia de las TS a la superficie de la placa. Si comparamos la morfología de las TS de

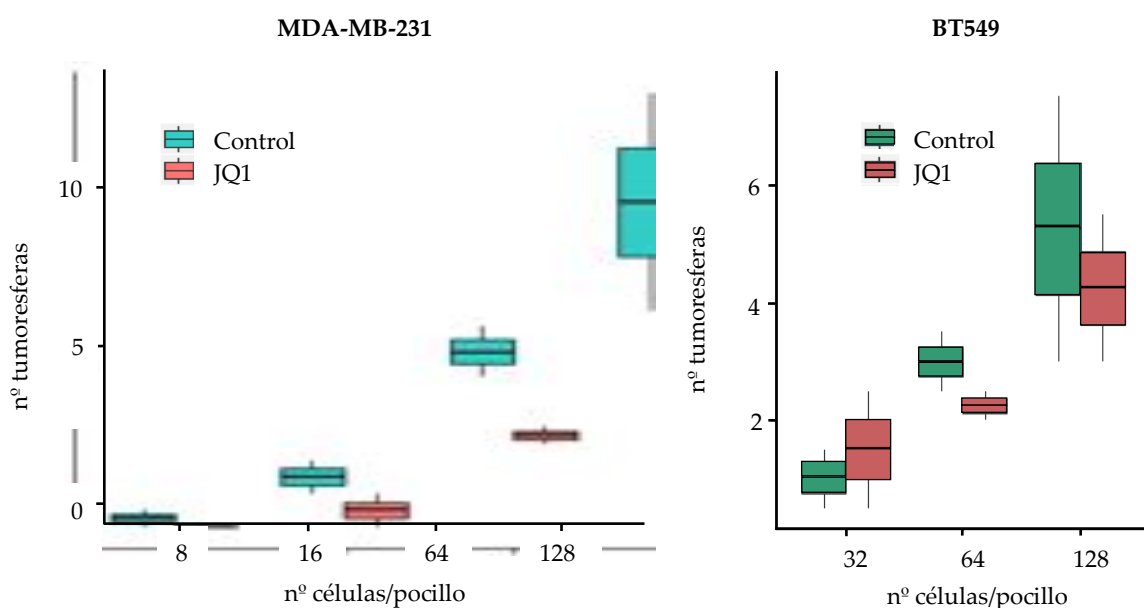
MDA-MB-231 tras tratarlas con JQ1 (200nM) respecto al control observamos como la esfera pierde la conformación 3D característica de las CSC, se aplana, se adhiere a la placa, e incluso pasa a un estado diferenciado que le permite migrar por la placa de cultivo. Este hecho nos indica que existe una pérdida de las características de *stemness* tras el tratamiento. Es importante destacar que este efecto también se observa al exponer las TS a otro iBET, como es el OTX-015, lo que apoya el papel de las proteínas BET, en concreto, de BRD4, en el mantenimiento de la *stemness* en TNBC (Figura 22a).

En paralelo al estudio morfológico, se determinó la expresión de *CD44* por inmunofluorescencia en las TS que quedaban en suspensión en las dos condiciones, en comparación con las TS sin tratar. Como se puede observar, el tratamiento con ambos iBET provocó una marcada disminución en la expresión de *CD44* en la membrana celular de las TS, sobre todo al emplear OTX-015 (Figura 22b). A pesar del incremento de los marcadores de *stemness* en el modelo de TS, tras exponer las TS a JQ1 los niveles de *CD44* en la superficie celular disminuyeron, lo cual era indicativo de una disminución de las propiedades *stemness*.



**Figura 22: Los iBET (JQ1 y OTX-015) provocan la pérdida de las características de *stemness*.** a) Se sembraron las células MDA-MB-231 y a las 24h, se trataron con JQ1 (200 nM) y OTX-015 (400 nM). La formación de estructuras 3D fue monitorizada durante los 3 días siguientes. Se muestra una imagen representativa de uno de los 3 experimentos realizados. Las fotografías se obtuvieron mediante el microscopio óptico invertido, 20X. b) Tumorosferas de MDA-MB-231 fueron crecidas en cubreobjetos. Se trataron con JQ1 (200 nM) y OTX-015 (400 nM) y se observó la inmunoreactividad de CD44 (rojo) y DAPI (azul) mediante microscopía confocal. Las células tratadas con JQ1 y OTX-015 muestran menos número de tumorosferas y menor marcaje de CD44.

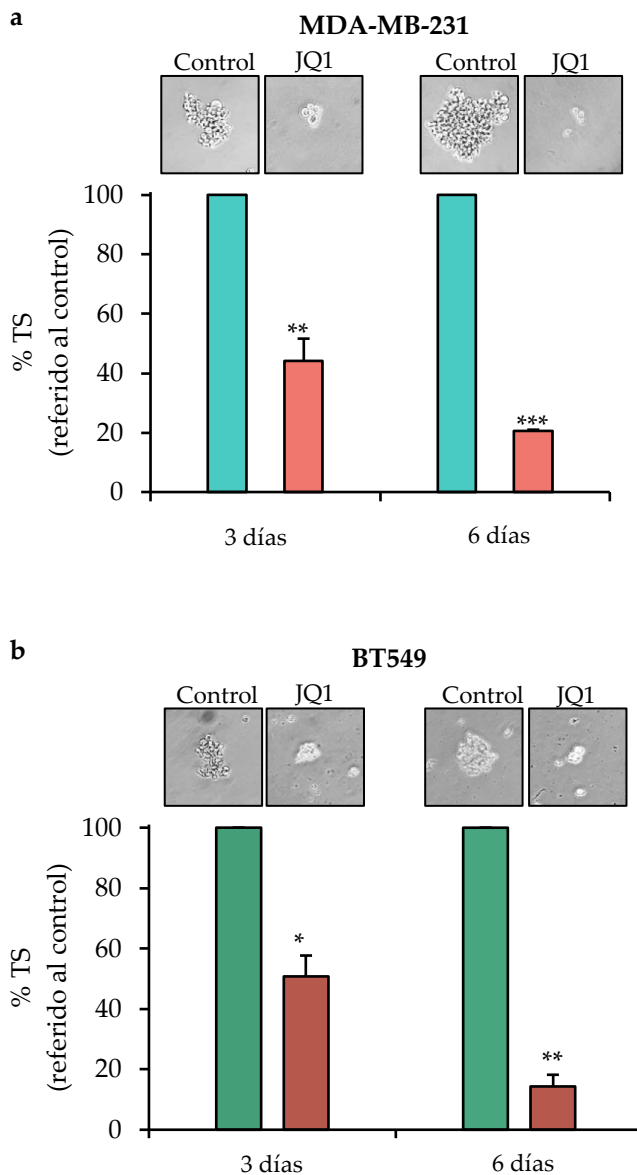
A continuación, se evaluó el impacto de JQ1 sobre la capacidad de autorenovación de las TS, una de las principales características de las CSC (Najafi et al., 2019). Para ello, se realizó un ensayo de dilución límite en el que se evaluó la capacidad de formación de TS en presencia de JQ1 a partir de un número de células controlado. Como se observa en la figura, tanto MDA-MB-231 como BT-549 mostraron una capacidad reducida para formar TS primarias tras ser expuestas al iBET, JQ1 (Figura 23), respaldando el efecto negativo de JQ1 en la *stemness*.



**Figura 23: Evaluación de la capacidad de autorrenovación de las tumorosferas.** Los esferoides MDA-MB-231 y BT549 se disociaron mecánicamente seguido de diluciones en serie para cubrir un rango de 1 a 200 células por pocillo (por triplicado). Se realizó el ensayo de dilución límite en ausencia y presencia de JQ1 (200 nM) para evaluar la capacidad de auto-renovación de los modelos de esferoides. La capacidad de formar tumorosferas en ambas condiciones se evaluó en el día 21 y se contaron los esferoides formados.

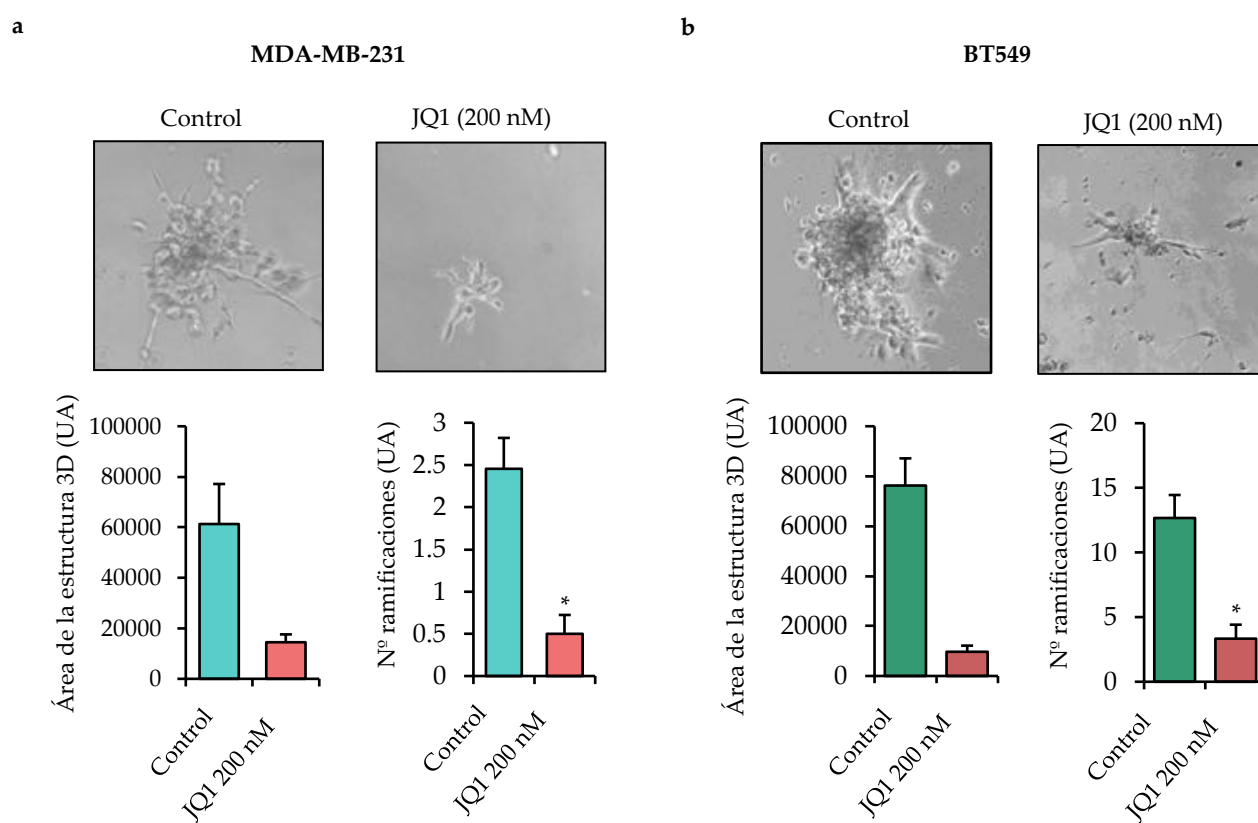
Para investigar más a fondo la influencia de JQ1 sobre las propiedades *stemness* de las TS, se llevaron a cabo ensayos de formación de TS secundarias y terciarias usando los modelos establecidos. En línea con los resultados anteriores, la exposición a JQ1 condujo a una drástica reducción tanto en el tamaño como en el número de TS cuando estaban expuestas al tratamiento con JQ1 tanto en el modelo de TS MDA-MB-231 (Figura 24a) como en el de las BT-549 (Figura 24b), lo que era indicativo del efecto negativo del JQ1 sobre la

capacidad de autorrenovación de estas células. Los esferoides tratados con JQ1 perdían la capacidad de formar de nuevo TS secundarias y terciarias, hecho que no sucede en los controles. Estos resultados junto con el anterior reflejan el impacto que este inhibidor podría tener sobre la capacidad de iniciación tumoral.



**Figura 24: El JQ1 reduce la capacidad de formación de TS secundarias.** Los esferoides MDA-MB-231 (a) y BT549(b) se disociaron mecánicamente y luego se expusieron a JQ1 (200 nM). Las TS secundarias se contaron en el día 3 y, posteriormente, se disociaron de nuevo para producir esferoides terciarios (día 6). Se tomaron fotos en ambos puntos de tiempo usando un microscopio óptico invertido. Se muestra una imagen representativa de uno de los 3 experimentos realizados para cada línea celular. Los resultados mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

Debido a que las CSC se les atribuye, entre otras propiedades, una alta capacidad de invasión, así como de dar lugar a metástasis, se llevaron a cabo ensayos 3D en Matrigel con el fin de investigar el potencial de invasión de nuestros modelos tras tratamiento con JQ1. Estos ensayos tienen como objetivo mimetizar un cultivo 3D para observar cambios potenciales en la morfología, supervivencia y capacidad invasiva/metastásica. A la vista de los resultados obtenidos, el iBET JQ1 impide la capacidad de invasión característica de los esferoides, lo que se refleja en una disminución del área de las estructuras 3D formadas y una reducción del número de ramificaciones de las mismas (*Figura 25*).

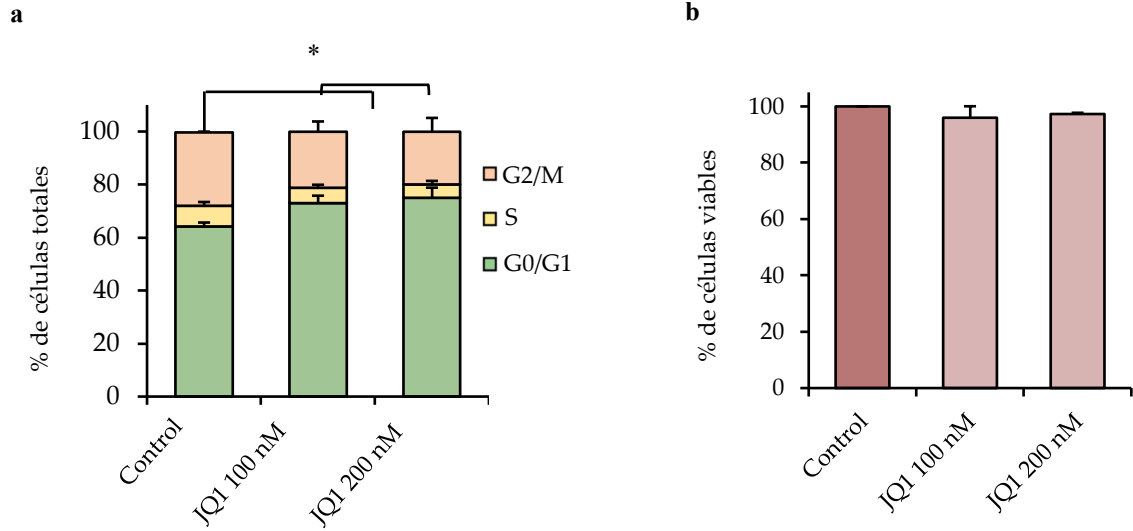


*Figura 25: potencial de invasión de las tumorosas a través de ensayos Matrigel 3D. TS de MDA-MB-231 (a) o BT549 (b) recién disociadas (10.000 células/pocillo en placas de 48 pocillos) se colocaron cuidadosamente sobre una fina capa de matrigel. 24 h más tarde, las células incorporadas en la matriz se dejaron sin tratar o se expusieron a JQ1 (200 nM). 48 h después, se tomaron imágenes de las estructuras de invasión, y se evaluaron las áreas de las estructuras 3D y el número de ramificaciones de cada condición.*

Estudios previos en nuestro grupo han demostrado que el iBET JQ1 influye sobre el crecimiento celular en líneas celulares adherentes de TNBC, como MDA-MB-231, promoviendo la expresión de genes que activan los puntos de control del ciclo celular, provocando, como consecuencia, una parada en la fase G0/G1 (Nieto-Jiménez et al., 2017). Sin embargo, el efecto que este inhibidor tiene sobre el ciclo celular de la población de CSC de TNBC no había sido explorado hasta la fecha. Para acabar con esta incógnita, llevamos a cabo un análisis de ciclo celular por citometría de flujo de TS de MDA-MB-231 tras exposición al fármaco. El análisis de los datos obtenidos reveló que, de manera similar a lo que sucede para células adherentes, el JQ1 también produce un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular de las células que componen los esferoides (*Figura 26a*).

Aunque, se sabe que la inhibición de BRD4 no tiene grandes implicaciones en el proceso de muerte celular programada o apoptosis en líneas inmortalizadas de TNBC adherentes, quisimos determinar qué efecto tenía este iBET sobre los modelos de TS de TNBC establecidos. Tras analizar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, no se observó ningún impacto significativo en la muerte celular de MDA-MB-231TS tras la exposición al compuesto (*Figura 26b*). Aún así, el uso de este inhibidor podría ser interesante, no por su impacto directo sobre la muerte celular, sino por su capacidad de reducir las propiedades *stemness* características de la población de CSC presente en el tumor, responsable en gran medida de la resistencia a los tratamientos y las recurrentes recidivas en los pacientes. La pérdida del fenotipo de células madre como consecuencia del tratamiento con JQ1 podría conducir a tumores menos agresivos y más sensibles a la quimioterapia, con lo que su tratamiento combinado con otros inhibidores o agentes quimioterápicos podría ser más eficiente, y en consecuencia producir un aumento de la muerte en las células tumorales.





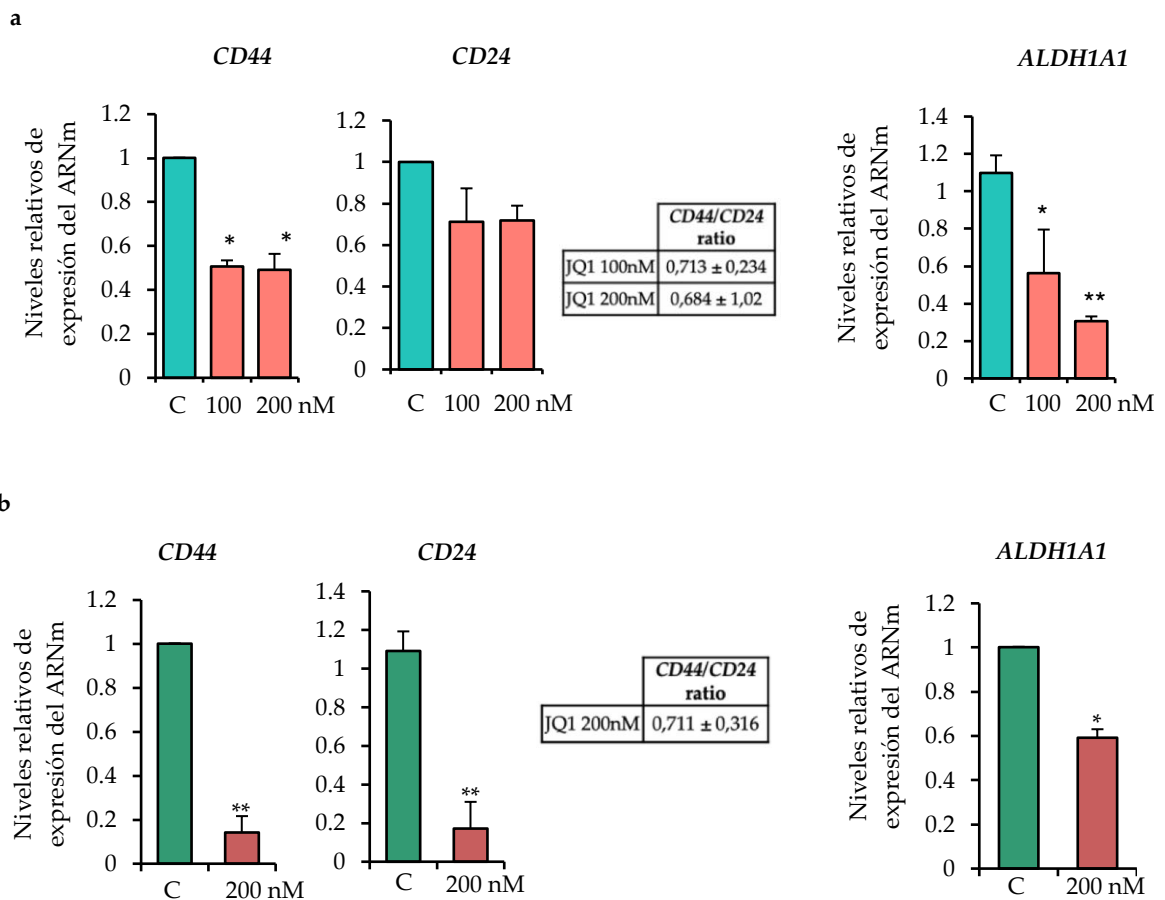
**Figura 26: representación del ciclo y muerte celular en MDA-MB-231TS.** a. Los esferoideos de MDA-MB-231 fueron incubados con JQ1 100 y 200 nM. Después de 24 h, se examinó la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo. La tinción de ADN se realizó con yoduro de propidio. El histograma muestra el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. b. Los esferoideos MDA-MB-231 se expusieron a las dosis indicadas de JQ1. Después de 72 h, se evaluó la actividad apoptótica mediante citometría de flujo por medio de la evaluación de la unión de Anexina V (AnV+). El histograma muestra el porcentaje de células viables (AnV-). Se representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes, Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 6.3. Análisis de genes relacionados con la *stemness* identificados en tumoresferas tratadas con JQ1 y tumores de xenoinjerto

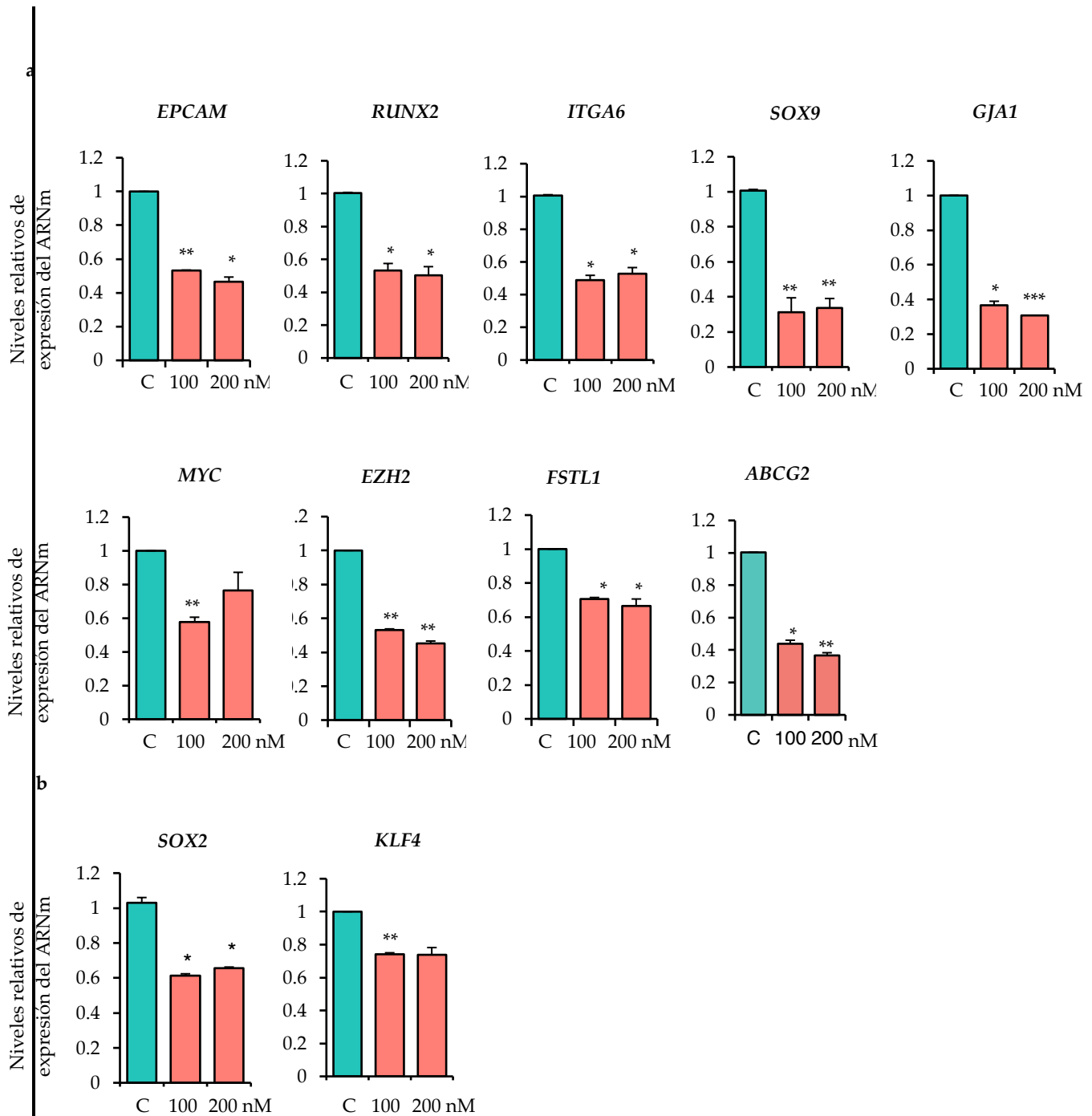
En el apartado anterior hemos validado los modelos de esferoides de MDA-MB-231 y BT-549 como modelos *in vitro* para el estudio de las características *stemness* en cáncer de mama. Así, hemos demostrado que estos modelos están enriquecidos en marcadores de CSC. Teniendo esto en cuenta, nos propusimos estudiar los hallazgos basados en el array en estos modelos y evaluar el efecto de JQ1 sobre los niveles de expresión de los 13 genes característicos de CSC identificados como desregulados en el array.

En un primer paso, se evaluó el impacto de JQ1 en la expresión de *CD44*, *CD24* y *ALDH1A1*. El tratamiento con JQ1 empujó a una marcada disminución de la ratio *CD44/CD24* ( $0,74 \pm 0,13$  y  $0,68 \pm 0,03$  para 100 y 200 nM, respectivamente, en el modelo MDA-MB-231, y  $0,71 \pm 0,09$  para 200 nM en el modelo BT-549), junto con una acentuada disminución de la expresión de *ALDH1A1* (Figura 27a y Figura 27b).

El tratamiento con JQ1 también disminuyó eficientemente la expresión de los marcadores de CSC *EPCAM*, *RUNX2* e *ITGA6*, así como los niveles de otros genes también contemplados en el panel de 13 genes anteriormente identificado en el array, como *MYC*, *EZH2*, *FSTL1*, *ABCG2* e incluso *GJA1*, que se sabe que está enriquecido en las poblaciones de *ALDH1+* (Phillips et al., 2017) (Figura 17A). Además, la exposición al iBET disminuyó también los niveles de expresión de ARNm de los dos marcadores clásicos de *stemness* implicados en la carcinogénesis y malignidad tumoral identificados y enriquecidos en TS (Figura 28a), *SOX2* y *KLF4* (Figura 28b).

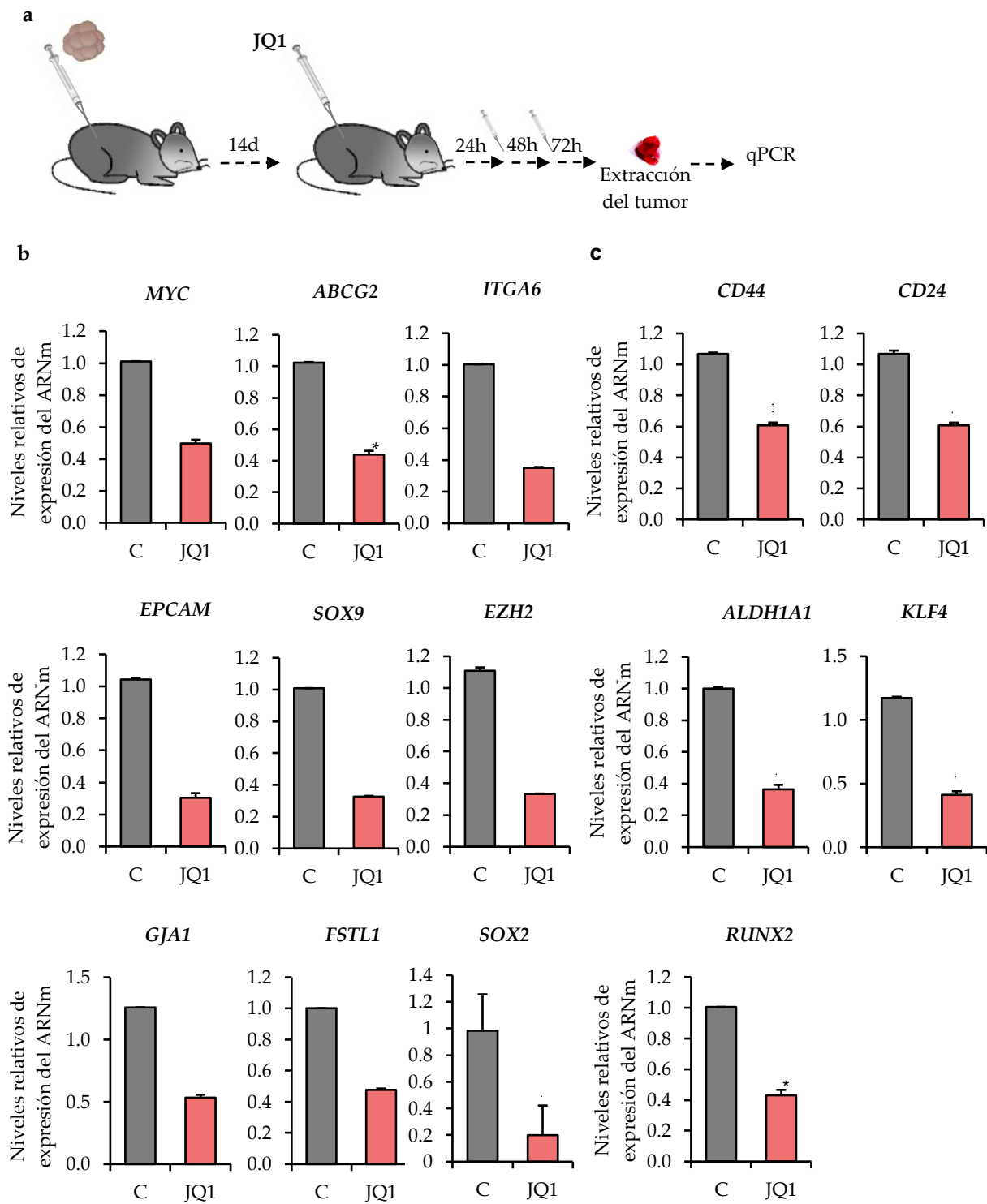


**Figura 27:** El JQ1 disminuye eficientemente la expresión de los marcadores CSC en las TS de MDA-MB-231 (a) y BT549 (b). tras el tratamiento con JQ1 a concentraciones de 100 y 200 nM se determinaron los niveles relativos de ARNm en las TS de MDA-MB-231 (a) y BT549(b) de los genes indicados. Las condiciones de la qPCR y las secuencias de los cebadores se describen en material y métodos. Todos los resultados se representan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 28:** Disminución de los niveles de mRNA relativos tras un tratamiento con JQ1 (100nM y 200 nM) en los genes asociados con las características stemness. Las condiciones de la qPCR y las secuencias de los cebadores se describen en material y métodos. Todos los resultados se representan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Prueba *t*-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Para comprobar el impacto que tiene el JQ1 sobre el panel de genes identificados relacionados con la *stemness* en un contexto más fisiológico, se evaluó su efecto en un modelo preclínico *in vivo* de xenoinjertos derivados de los esferoides MDA-MB-231. Así, se inyectaron de forma ortotópica, es de decir, en la línea mamaria de ratones desnudos Balb/c (hembra, 6 semanas), esferoides de MDA-MB-231 recién disociados. Dos semanas más tarde, los ratones portadores de tumores se trataron con JQ1 durante tres días consecutivos. Una vez completado el régimen de tratamiento, se extrajeron los tumores, se procesaron y se analizaron los niveles de ARNm del panel de genes identificados (*Figura 29a*). Los resultados revelaron que el tratamiento con JQ1 también disminuía la expresión de los genes *MYC*, *ABCG2*, *ITGA6*, *EPCAM*, *SOX9*, *EZH2*, *GJA1*, *FSTL1* y *SOX2* en este modelo *in vivo* (*Figura 29b*). A su vez, también tuvo un efecto negativo en la expresión de *CD24*, *CD44*, *ALDH1A*, *KLF4* y *RUNX2* (*Figura 29c*), lo que apoya aún más el papel potencial de este iBET para alterar la firma *stemness* en TNBC.



**Figura 29: JQ1 afecta la expresión relativa de mRNA de los marcadores de CSC en un modelo preclínico in vivo.** a) Ratones Balb/nu (hembras, 6 semanas) fueron inyectados con TS de MDA-MB-231. A los 14 días cuando el tumor era lo suficientemente grande, se dieron los tratamientos con JQ1. Finalmente se procedió a la extracción del tumor, y se determinaron los niveles relativos de ARNm de los genes identificados mediante qPCR. b) Niveles de ARNm de MYC, ABCG2, ITGA6, EPCAM, SOX9, EZH2, GJA1, FSTL1 y SOX2 en los tumores formados de TS de MDA-MB-231 inyectadas en ratones Balb/nu tumores tratados con JQ1 en comparación con los tumores tratados con vehículos. Se analizaron por qPCR los genes seleccionados después de 72 horas tras el tratamiento con JQ1 50 mg/Kg. Las condiciones de la qPCR y las secuencias de los cebadores se describen en material y métodos. c) Cambios en los niveles de ARNm de CD44, CD24, ALDH1A1, KLF4 y RUNX2 observados durante la exposición a JQ1. Las condiciones de la RT-qPCR se describen en el material y los métodos. Todos los resultados se representan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Prueba t-Student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 6.4. La firma *stemness* asociada a JQ1 predice un peor resultado para el paciente

Debido a la naturaleza agresiva de los TNBC y la falta de tratamientos dirigidos actuales, existe la necesidad de buscar otras opciones de tratamiento. Una de ellas sería realizar estudios de expresión genética e identificar posibles dianas que puedan ser abordadas de forma selectiva en TNBC. Con este fin, decidimos evaluar el papel de los genes identificados en la recaída de la enfermedad, medida como la reaparición del tumor y su asociación con el resultado clínico en pacientes con TNBC. Para ello usamos la herramienta online Kaplan-Meier Plotter (Györfy et al., 2010) que nos proporciona como resultado una curva que compara la relación existente entre la expresión de los genes seleccionados y el resultado clínico de los pacientes de TNBC para la supervivencia libre de recidiva (RFS), determinando por tanto el pronóstico de la enfermedad en relación con la expresión génica del tumor.

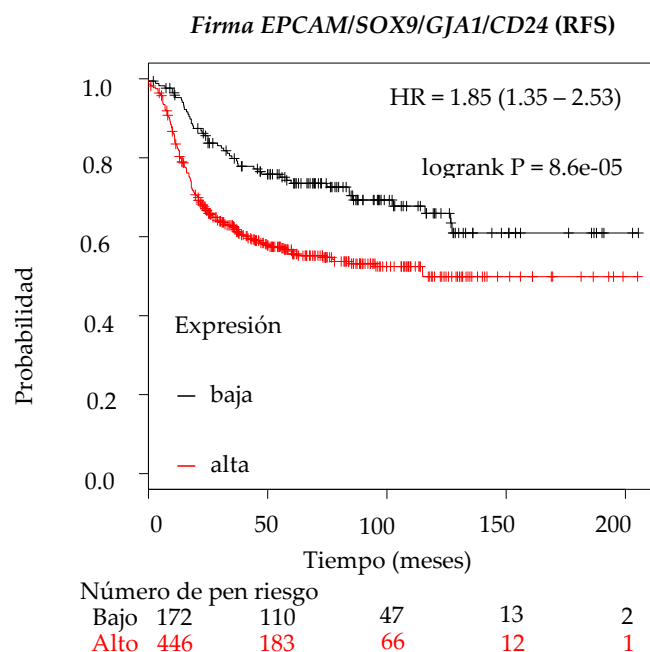
Una vez analizados los datos, encontramos que los altos niveles de expresión de cuatro de los genes, *GJA1*, *CD24*, *EPCAM* y *SOX9*, correlacionaban de forma significativa ( $p \leq 0.05$ ) con una peor RFS. Como se observa, el riesgo relativo (HR, del inglés *Hazard Ratio*) de que ocurra un evento, en este caso una recaída de la enfermedad es mayor a 1 ( $HR \geq 1$ ). Siendo, *GJA1* HR = 1.55 (1,21-2), p-valor = 0,00057; *CD24* HR = 1,5 (1,14-1,97), p-valor = 0,0034; *EPCAM* HR = 1,41 (1,09-1,83), p-valor = 0,0089; *SOX9* HR = 1,41 (1,09-1,81), p-valor = 0,0075, respectivamente) (Tabla 4). En cuanto a los genes restantes del panel no se obtuvo ninguna asociación significativa con el resultado clínico.

Tabla 4: Los genes controlados por JQ1 EPCAM, SOX9, GJA1 y CD24 se correlacionan con un mal pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad (RFS) en TNBC. La herramienta en línea Kaplan-Meier Plotter se utilizó para evaluar las posibles relaciones de los genes relacionados con la *stemness* regulados a la baja tras un tratamiento con JQ1 y la supervivencia libre de la enfermedad (RFS) en pacientes con cáncer de mama de tipo basal. En la tabla se enumeran los valores de Hazard Ratio (HR) y el p-valor de los genes EPCAM, SOX9, GJA1 y CD24 con una asociación significativa con una peor supervivencia sin recaídas (RFS). Los valores de corte utilizados para separar a los pacientes se refirieron a los mejores valores de corte, fueron 8464, 2557, 3196 y 4844, respectivamente.

K-M Plotter		
Gen	HR	p-valor
EPCAM	1,41 (1,09 - 1,83)	0,0089
SOX9	1,41 (1,09 - 1,81)	0,0075
GJA1	1,55 (1,21 - 2)	0,00057
CD24	1,5 (1,14 - 1,97)	0,0034

Para comprobar si el uso combinado de esta firma *stemness* asociada a recaída tenía un mayor valor predictivo que cada gen individualmente y, por tanto, se puede utilizar en la práctica clínica como marcador pronóstico, se realizó también un análisis combinado. El análisis combinado de esta firma de 4 genes reveló un mayor potencial para predecir el resultado para el paciente que cada gen por separado (HR = 1,85 (1,35-2,53), log-rank  $p=8,6e^{-05}$ ) (Figura 30). Que el HR de la combinación de todos los genes sea mucho mayor que cualquier HR de cualquier gen de forma individual, es indicativo de que el riesgo relativo de que los pacientes recaigan en la enfermedad es mayor cuando estos cuatro genes se encuentran sobrepresados a la vez en el tumor, pudiendo actuar de forma sinérgica para predecir un peor pronóstico clínico. Por tanto, la evaluación de este panel de cuatro genes podría tener potencial como biomarcador pronóstico de la enfermedad.





**Figura 30: Análisis combinado de EPCAM, SOX9, GJA1 y CD24 para la RFS en cáncer de mama basal utilizando la herramienta online KM Plotter.** Se realizó un análisis combinado con los cuatro genes para evaluar su relación con el pronóstico del paciente. Los gráficos de Kaplan-Meier comparan los tumores con una baja expresión combinada de estos cuatro genes con aquellos que exhiben una alta expresión combinada. Se indican los valores de HR y el logaritmo p. El valor de corte seleccionado = 3733,5.

Como hemos insistido desde la introducción, uno de los grandes problemas que presenta el TNBC es que todavía carece de terapias dirigidas o específicas, y por tanto su tratamiento se limita a cirugía, radioterapia o quimioterapia estándar. Sin embargo, aunque la quimioterapia, tratamiento más empleado, muestra efectos notables en el control de la enfermedad durante el tratamiento inicial, una gran mayoría de los tumores de pacientes con TNBC son o acaban siendo refractarios a estos compuestos, y acaban desarrollando resistencia a medida que avanza el tratamiento, lo que dificulta aún más su manejo y provoca que sean más invasivos y presenten un peor pronóstico.

Por este motivo, mediante la herramienta de libre acceso ROC plotter, se evaluaron las posibles correlaciones entre la expresión de cada uno de los 13 genes identificados y la respuesta a terapia antitumoral basada en quimioterapia en más de 2000 muestras de pacientes con cáncer de mama. Nuestro análisis reveló que los niveles altos de expresión de ARNm de dos de los genes identificados como alterados por JQ1, ABCG2 y RUNX2,

correlacionan con una peor respuesta a quimioterapia, lo que podría tener un papel en el desarrollo de resistencias (Figura 31).

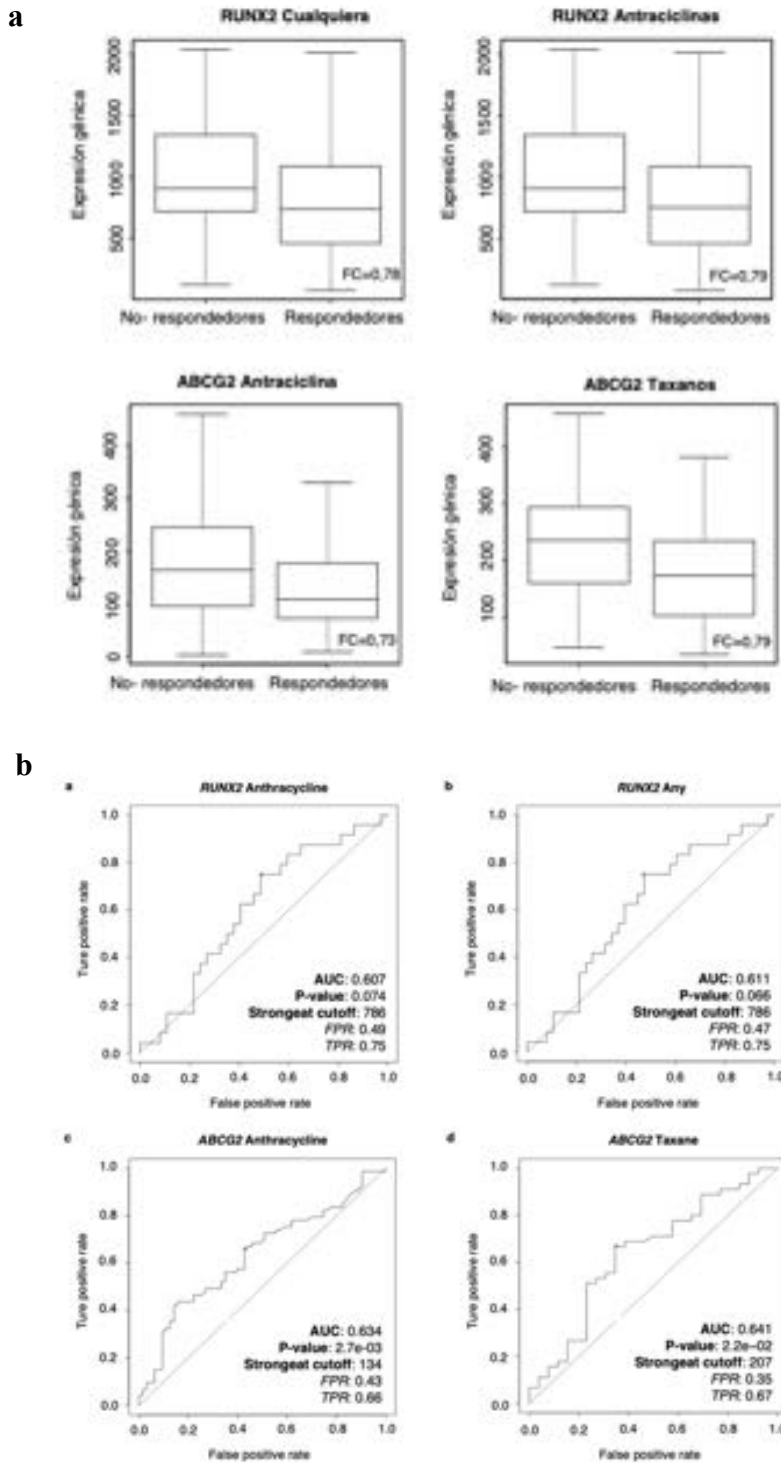


Figura 31: Análisis de la respuesta a tratamiento de RUNX2 para cualquier agente quimioterápico y antraciclinas; y de ABCG2, para antraciclinas y taxanos. Utilizando los datos transcriptómicos de 2108 pacientes con los datos disponibles sobre el tratamiento y la respuesta en la herramienta de libre acceso ROC plotter, se evaluaron las posibles asociaciones entre 13 genes relacionados con la stemness controlados por el JQ1 y las respuestas de los pacientes a la quimioterapia. A) Los niveles de expresión relativa de ARNm de ABCG2 y RUNX2 en pacientes que respondieron y no respondieron al tratamiento, medidos como RFS cinco años después de la finalización de la quimioterapia, se muestran para varios regímenes de quimioterapia. B) ROC-plot de ABCG2 y RUNX2 ROC para el régimen de quimioterapia indicados.

*ABCG2*, un gen bien estudiado y asociado a la resistencia a múltiples fármacos (Gottesman et al., 2002), mostró correlación con respuesta a tan sólo dos quimioterapias (Taxanos y Antraciclinas). Mientras que los altos niveles de expresión de *RUNX2* se asociaron con baja respuestas a cualquier tipo de quimioterapia (Taxanos, Antraciclinas, Ixabepilonas, CMF (Ciclofosfamida / Metotrexato / Fluorouracilo), FAC (Fluorouracilo / Adriamicina / Citoxano), y FEC (Fluorouracilo / Epiroxorrubicina / Ciclofosfamida). Por lo tanto, *RUNX2* podría servir como un biomarcador universal para predecir la respuesta a la quimioterapia. Nuestro trabajo es el primero hasta la fecha en identificar este gen como marcador de resistencia.

## 6.5. Discusión

En resumen, en esta primera parte de la tesis, describimos que el iBET JQ1 es capaz de alterar la transcripción de una firma de genes relacionados con la *stemness* y, por tanto, alterar las propiedades de las CSC presentes en el tumor. Esto conlleva la disminución de la expresión marcadores de células madre, como *CD44*, *CD24*, *ALDH1*, *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC*, *EPCAM*, *EZH2*, *GJA1*, *SOX9* y *FSTL1*, el aumento de genes represores de vías de señalización implicadas en el mantenimiento de la población CSC, como *PIAS3*, la alteración de funciones relacionadas con la *stemness*, la disminución de las capacidades de autorenovación, de formación de TS secundarias y terciarias, del potencial invasivo característico de las CSC y un aumento más marcado de la detención del ciclo celular en G0/G1. El panel de genes identificado podría tener un papel clave no solo en la predicción de la respuesta del paciente a la quimioterapia y su pronóstico clínico, sino también en la prevención de la aparición de recidivas, comunes en TNBC, debido al gran porcentaje de CSC presentes en el tumor.

En los últimos años la epigenética ha ido adquiriendo un gran interés por su importancia en la progresión del tumor y la respuesta al tratamiento. La capacidad *stemness* de los tumores, junto con sus rasgos epigenéticos, pueden definir el potencial de malignidad oncogénico y, por tanto, la agresividad del tumor. De hecho, el TNBC se caracteriza por una población tumoral enriquecida de CSC que le confieren resistencia y agresividad

terapéutica intrínseca (Dean et al., 2005; Bianchini et al., 2016). Por este motivo, existe la necesidad de identificar firmas de genes asociados con la *stemness* tumoral para así poder predecir el pronóstico de los pacientes y su futura respuesta al tratamiento. Este enfoque podría ser prometedor para tratar el TNBC mediante un tratamiento más dirigido y efectivo. En esta parte de la tesis hemos establecido un panel de 13 genes asociados con *stemness* que podrían ser críticos en la elección del tratamiento de pacientes con TNBC y su RFS, y cuya alta expresión puede ser controlada mediante inhibidores contra la familia de lectores epigenéticos BET.

Nuestro análisis transcriptómico reveló que el iBET JQ1 afecta a la función de diferenciación, más concretamente a las funciones de diferenciación de células madre, diferenciación mesenquimal, regulación de la diferenciación celular y diferenciación de células endoteliales. Además, afecta a los niveles de expresión de ARNm de los genes involucrados en la iniciación y el mantenimiento del fenotipo *stemness* *MYC*, *EZH2*, *SOX9* y *RUNX2*, tanto en modelos 2D y 3D, enriquecidos en marcadores de células madre, como en modelos *in vivo*, que representan un contexto más cercano al real.

Del mismo modo, JQ1 puede desregular los genes relacionados con la *stemness* que codifican para proteínas involucradas en varias funciones relacionadas con la progresión del cáncer, la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia, el mal pronóstico y/o la metástasis, como *EPCAM*, *ABCG2*, *ITGA6*, *GJA1*, *FSTL1* y *PIAS3* (Dean et al., 2005; Munz et al., 2009; Hiraga et al., 2016; Hu et al., 2016; Mostert et al., 2012; Phillips et al., 2017; Lau et al., 2017; Qin et al., 2019, p. 3; Banerjee & Resat, 2016).

Por otro lado, el tratamiento con JQ1 redujo casi a la mitad los niveles de expresión de los genes indicadores de la malignidad de la población tumoral *CD44*, *CD24*, y *ALDH1* (Li et al., 2017), tanto en modelo adherente como en el TS, en MDA-MB-231 y BT-549. Además, indujo a una marcada disminución de la ratio *CD44/CD24* en ambos casos, junto con una acentuada disminución de la expresión de *ALDH1A1*.

Igualmente, nuestros resultados demuestran que JQ1 afecta al crecimiento de las tumorosferas, a la autorrenovación y a la capacidad metastásica o de invasión, propiedades características de las CSC que están presentes en los tumores y podría influir

en la adquisición de resistencia a los tratamientos y la recidiva de los pacientes. Además, el iBET JQ1 afecta al ciclo celular produciendo una parada en G0/G1 tanto en células adherentes como en TS. En cambio, este efecto no se debe a un aumento de la muerte celular, sino que podría producirse como consecuencia de la disminución de las propiedades *stemness* característica de la población de CSC presente en el tumor. De esta forma el tumor podría volverse menos agresivo y más sensible a la quimioterapia, con lo que la combinación de JQ1 con algún otro inhibidor o agentes quimioterápicos podría aumentar la muerte celular y a su vez, obtener mejores resultados en el tratamiento del TNBC.

Cabe decir que cuatro de los genes *stemness* que inicialmente identificamos en el panel tras el análisis transcriptómico, que pueden ser reprimidos en presencia de un tratamiento con JQ1, se correlacionan con una peor progresión de la enfermedad en los pacientes-(*EPCAM*, *SOX9*, *GJA1* y *CD24*). Esta correlación es todavía mayor cuando se realiza un análisis combinado de los cuatro genes. Además, sería interesante en el futuro identificar drogas que vayan dirigidas específicamente a esta firma. Por otro lado, en este estudio hemos identificado dos genes *ABCG2* y *RUNX2*, incluidos en la firma *stemness* inicial, que correlacionan con una peor respuesta a la quimioterapia cuando sus niveles de expresión eran más altos. De entre los dos biomarcadores, el único que correlacionaba con una peor respuesta a cualquier quimioterapia fue el *RUNX2*, por lo que proponemos que pudiese utilizarse como un posible biomarcador para predecir la respuesta a la quimioterapia en TNBC, siendo en este trabajo el primero hasta la fecha en atribuirle a *RUNX2* esta característica. Si bien es cierto que cabría esperar que los genes identificados tanto en las curvas de supervivencia del KM Plotter como en la herramienta online ROC Plotter fuesen los mismos, no es así. Y esto puede ser debido a que la herramienta online ROC Plotter hoy en día se encuentra aún en desarrollo, llevando poco tiempo operativa. Esta herramienta se basa en datos relativos al número de pacientes que aparece en su base de datos, por lo que suponemos que con el tiempo irán incluyendo un mayor número de pacientes con lo que los datos obtenidos tras su uso y las conclusiones obtenidas serán más sólidas.

En resumen, todos los resultados que comportan esta primera parte respaldan la capacidad del iBET JQ1 para provocar la pérdida de la identidad “stem” a través de la disminución de la firma de genes descrita (Figura 32). En la actualidad no existe ningún fármaco cuya diana terapéutica específica sea la *stemness*, por lo que los iBET serían unos buenos candidatos clínicos para ser los primeros fármacos en atacar dicha propiedad en TNBC.

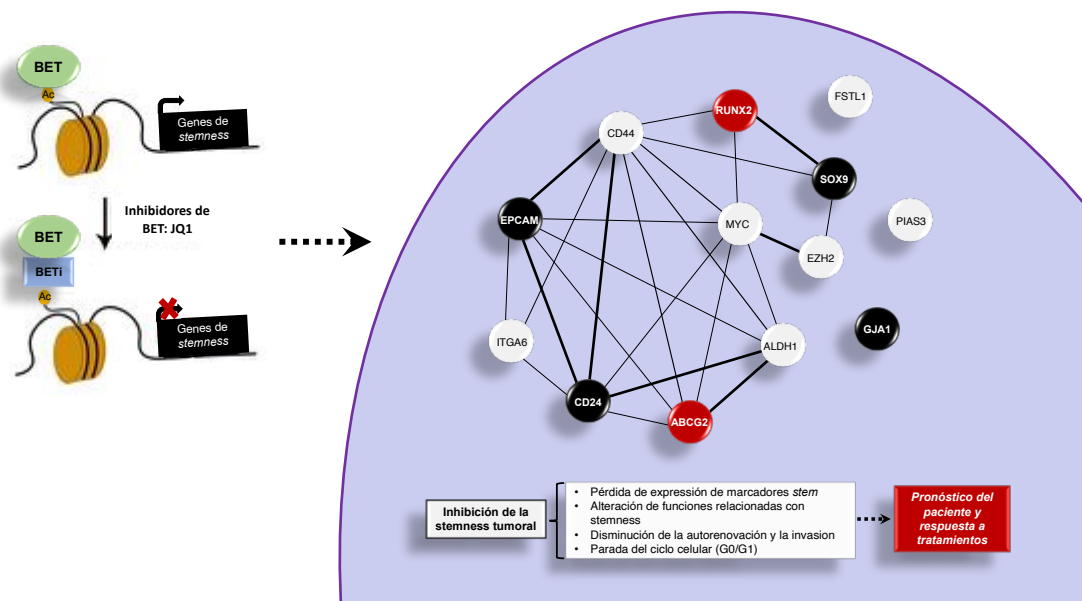


Figura 32: Efecto de los inhibidores BET en la firma stemness identificada.

Aunque los iBET presentan una actividad antitumoral relevante en TNBC *in vitro* (Nieto-Jimenez et al., 2020; Nieto-Jiménez et al., 2017), el efecto del JQ1 como monoterapia en pacientes parece ser limitado para el tratamiento del cáncer (Sahni & Keri, 2018). Como hemos comprobado en los modelos de TS, el JQ1 no induce cambios significativos sobre la muerte celular, en cambio, sí que esta afectando a las propiedades *stemness*, como la pérdida de expresión de los marcadores de *stem*, la alteración de las funciones relacionadas con las *stemness* y la disminución de la autorenovación, la invasión, y la metástasis. Puesto que los TNBC están compuesto por un gran porcentaje de CSC, y estas células, entre otros factores, son las causantes de la resistencia adquirida a los tratamientos, al disminuir las CSC, o al menos bloquear sus características principales, podríamos, en cierta medida, reducir potencialmente la refractoriedad habitualmente producida frente a los

tratamientos quimioterápicos en pacientes con TNBC. Nuestros datos evidencian que el inhibidor de BRD4 JQ1 podría ser aún más eficaz en combinación con otros fármacos contra el cáncer, como también apuntan otros trabajos de nuestro grupo (Nieto-Jimenez 2020, Cancer letters). En esta línea, evaluar su combinación con otros tratamientos sería de gran importancia en el futuro.

7

R E S U L T A D O S Y  
D I S C U S I Ó N

PARTE 2

Disfruta de lo que haces y entonces harás  
tu mejor esfuerzo.

KATHERINE JOHNSON



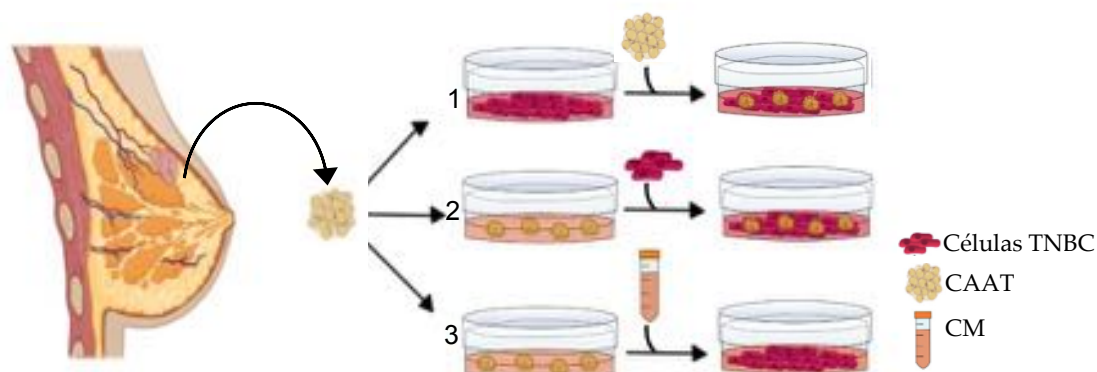


## 7. Resultados y Discusión, parte 2: El componente adiposo constituye un nicho protector para las células tumorales a través de la activación de la familia de quinasas Src en TNBC

Como hemos visto en la introducción, las células tumorales no trabajan solas en el desarrollo de la enfermedad, sino que se encuentran influenciadas e interaccionan al mismo tiempo con el microambiente que las rodea. El resultado de esta interacción contribuye a la heterogeneidad de los tumores. De este modo, las células tumorales pueden crecer, detenerse o morir en función de la presencia de factores de crecimiento y citoquinas definidas por el entorno y de las mutaciones tanto epigenéticas como genéticas que van adquiriendo y que albergan en si mismas. Por lo tanto, es concebible que el microambiente pueda ser capaz de forzar la evolución genética hacia algunas mutaciones que favorecen la supervivencia de las células tumorales, mientras que los cambios menos favorables las conducen a la muerte y no son seleccionadas positivamente por el microambiente. En el caso concreto del cáncer de mama, el tejido adiposo es el principal componente del nicho tumoral (Lapeire et al., 2014), y, a través de sus factores secretados (SAF), parece ser un actor clave en el comportamiento de estos tumores. La activación de las vías moleculares mediadas por el tejido adiposo asociado al cáncer (CAAT) podría ser responsable de la frecuente baja respuesta al tratamiento en el TNBC (Castells et al., 2012). Además, el exceso de tejido adiposo se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Nuncia-Cantarero et al., 2018).

## 6.5. EL TEJIDO ADIPOSO ASOCIADO A TUMOR MODIFICA LAS CÉLULAS DE TNBC MONOCAPA Y PROMUEVE UN ESTADO INDIFERENCIADO

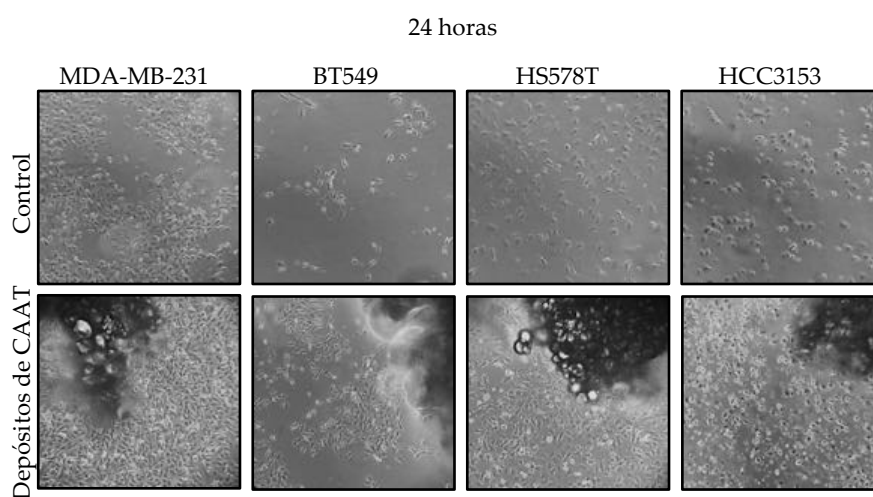
Con el propósito de estudiar cómo el secretoma adiposo influye en el desarrollo del TNBC, diseñamos un modelo destinado a mimetizar el microambiente tumoral del TNBC *ex vivo* (TNBC-TM). Para ello, usamos tejido adiposo peritumoral obtenido de pacientes con TNBC (CAAT) y células tumorales inmortalizadas de TNBC. En este caso, a diferencia del modelo usado en la primera parte de resultados en el que estudiamos las propiedades *stem* en un modelo 3D que simulaba la heterogeneidad intrínseca de los tumores, queríamos evaluar como contribuye el CAAT en la heterogeneidad tumoral a través de la comunicación existente entre las células tumorales y el CAAT empleando tres enfoques diferentes (Figura 33).



**Figura 33.** Diagrama de los tres enfoques realizados tras el aislamiento del CAAT. 1. Células TNBC adheridas expuestas a fragmentos de CAAT. 2. CAAT adherida a la placa expuesta a las células TNBC en suspensión. 3. Preparación del medio acondicionado (MC) del CAAT. Los fragmentos del CAAT se colocaron con un medio completamente fresco (KO DMEM + FBS). Tras 72 horas, se recogió el MC, que fue filtrado a través de una membrana 0.22 $\mu$ m (Millipore). Este medio se añadió a las células TNBC cultivadas las 24 horas previas en su medio de cultivo completo, sustituyendo un medio por otro.

En la primera de las aproximaciones, se depositaron pequeños fragmentos de CAAT sobre las 4 líneas celulares de TNBC inmortalizadas diferentes creciendo como monocapa (MDA-MB-231, BT549, HS578T HCC3153). Cabe destacar que en el plazo de 1 hora los

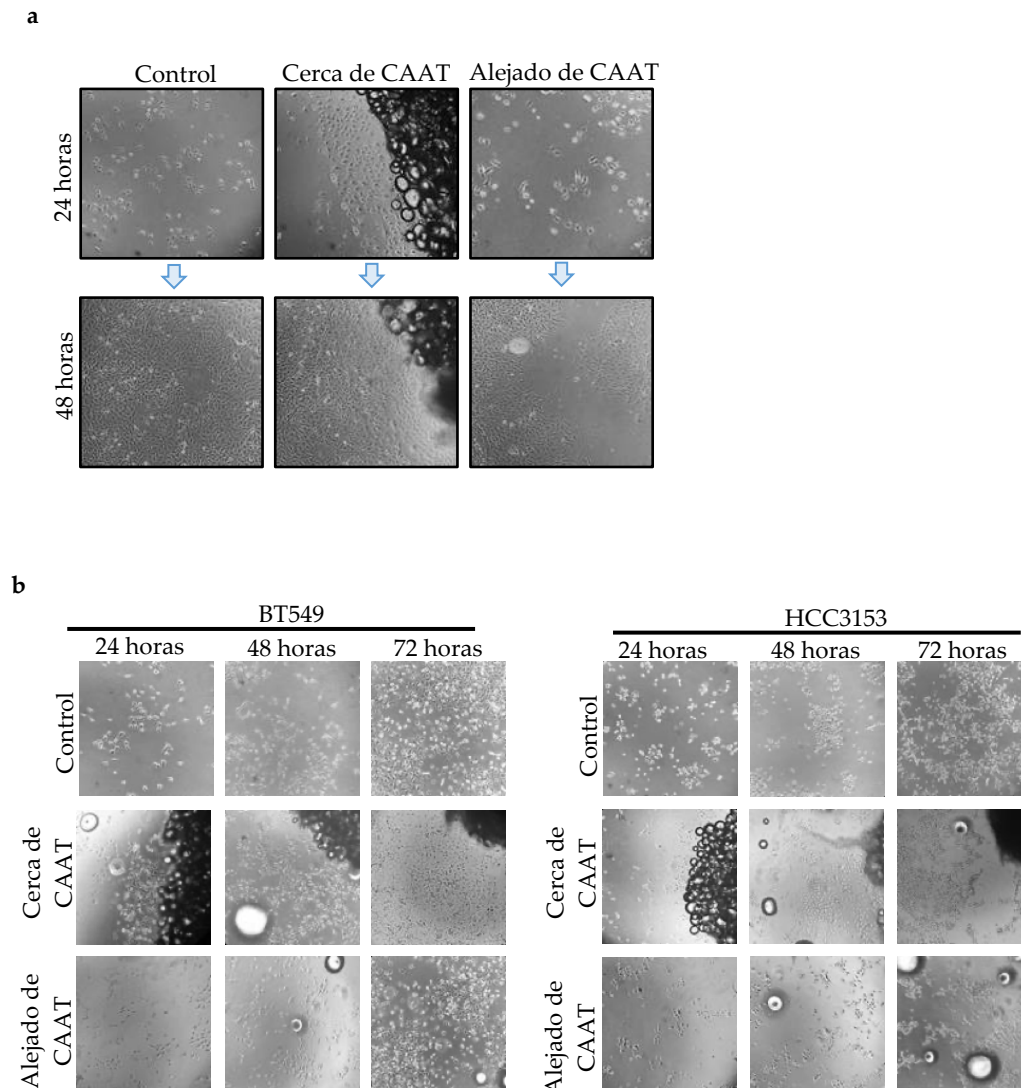
depósitos de CAAT se adhirieron firmemente a la placa de cultivo que contenía las células TNBC, mientras que los fragmentos de CAAT depositados en placas vacías (control, que contenían solo medio de cultivo) permanecieron flotando incluso 72 horas después. Esto apoya la existencia de una fuerte interacción entre las células de cáncer de mama y el CAAT. Después de un día de co-cultivo, y a pesar de partir de una distribución celular uniforme, se observó que las células TNBC eran más abundantes en los alrededores del depósito de grasa, mientras que la confluencia celular en otras áreas disminuía (*Figura 34*), lo que sugiere que la CAAT promueve la remodelación de la monocapa de células de cáncer de mama.



**Figura 34:** Los fragmentos de CAAT promueven la remodelación de las células TNBC monocapa. Observación de la confluencia de las células de TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T, y HCC3153) tras 24 horas de exposición a fragmentos de CAAT en comparación con la condición control (células de TNBC que no han estado expuestas a los fragmentos de CAAT). Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes.

Para estudiar más a fondo este efecto, utilizamos una segunda aproximación (*Figura 20.2*) en la que se depositaron las células de TNBC en placas de cultivo que previamente contenían depósitos de CAAT preadheridos. De esta forma podríamos evaluar el comportamiento de las células de TNBC ante los depósitos de grasa. De nuevo, observamos que las células tendían a acumularse cerca del CAAT. Estos resultados confirmaron las observaciones de la aproximación anterior (existencia de una estrecha

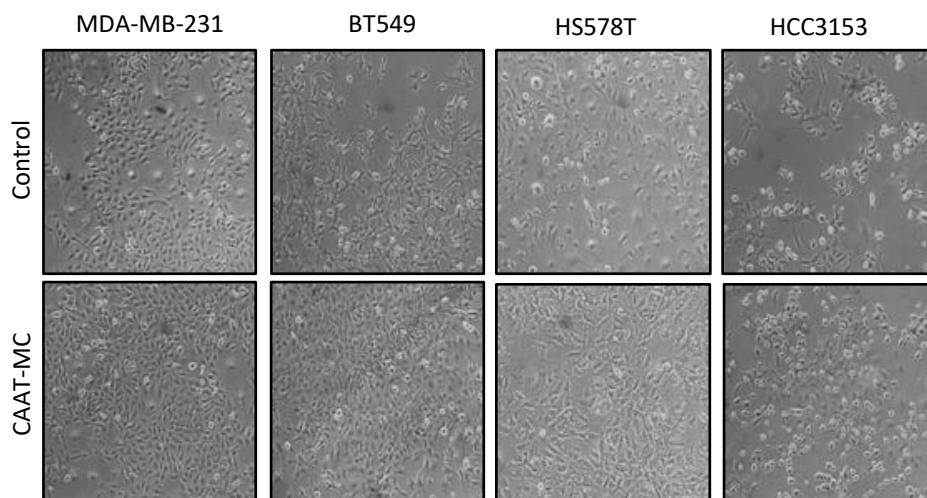
interacción y capacidad del CAAT para remodelar la monocapa de células de TNBC), pero también sugieren que el CAAT podría estar secretando factores que atraen a las células de TNBC antes de adherirse a la placa de cultivo (Figura 35).



**Figura 35: Los factores presentes en el secretoma del CAAT promueven la quimioatracción de las células de TNBC (MDA-MB-231, BT549 y HCC3153).** A) Observación tras 24 y 48 horas de los fragmentos de CAAT adheridos a la placa expuestos a las células MDA-MB-231 en suspensión. B) Observación tras 24 y 48 horas de los fragmentos de CAAT adheridos a la placa expuestos a las células MDA-MB-231 en suspensión. A y B) Las imágenes fueron tomadas en el área proximal al CAAT, lejos de CAAT y fueron comparadas con el control (células MDA-MB-231, BT549 o HCC3153 que no habían estado en contacto con el CAAT). Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

Para evaluar la importancia de los factores secretados, decidimos hacer una tercera aproximación en la que usamos el medio condicionado de CAAT (CAAT-MC),

conteniendo todos los factores secretados por éste (*Figura 33.3*), tal y como se describe en los materiales y métodos. Tras solo dos días, las células cultivadas en presencia del secretoma de CAAT habían alcanzado una mayor confluencia que las que habían crecido en ausencia de los factores de secreción del CAAT (*Figura 36*). Estos resultados apuntaban a que los efectos observados con las dos aproximaciones anteriores en cuanto quimioatracción y proliferación podían ser debidos a los factores secretados por el CAAT.

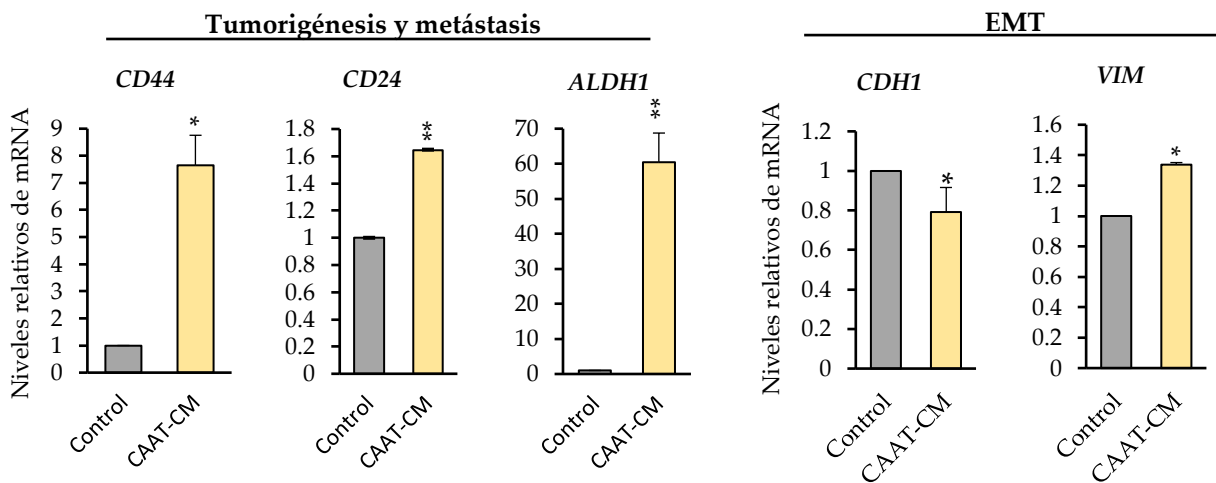


*Figura 36. Aumento de la proliferación de las células de TNBC tras 48 horas de exposición al secretoma de las CAAT, 24 horas después de su siembra en medio normal.*

Para evaluar cómo afecta a las células de TNBC la exposición al secretoma del CAAT a nivel molecular, evaluamos por qRT-PCR marcadores comúnmente empleados en la bibliografía para el estudio de la *stemness* tumoral (*CD44*, *CD24* y *ALDH1*) (W. Li et al., 2017, p. 1) y la transición epitelio-mesenquima (EMT) necesaria para la progresión del cáncer y la resistencia a fármacos (cadherina epitelial (*CDH1*) y vimentina mesentérica (*VIM*)) (Lamouille et al., 2014; Yuan et al., 2019) (*Figura 37*). Niveles más altos de *VIM* indican que las células tumorales están desplazadas hacia un estado más mesenquimal, o indiferenciado, propio de las células madre. Por el contrario, un aumento en los niveles de *CDH1* son indicativos de un estado más epitelial, o diferenciado, propio de las células epiteliales.

Tras analizar los niveles de expresión relativa de ARNm de estas células para los genes de *stemness*, se observó un aumento en la expresión de *CD44*, *CD24* y *ALDH1A*, siendo la ratio  $CD44/CD24 = 4,65$ . En cuanto a los marcadores de EMT, observamos un aumento de los niveles de expresión del biomarcador *VIM* y una disminución de *CDH1*. Estos valores eran indicativos de un desplazamiento más marcado de la EMT hacia un estado más indiferenciado.

Por tanto, estos resultados son indicativos de que los factores secretados por el CAAT al medio son suficientes para aumentar los marcadores de malignidad tumoral y *stemness* *CD44*, *CD24* y *ALDH1A*, así como promover la plasticidad celular de la EMT hacia un estado más mesenquimal, similar al de las células madre, por una disminución del marcador *CDH1* y un aumento de *VIM*.



**Figura 37:** Niveles relativos de expresión de ARNm de marcadores de tumorigénesis y metástasis (*CD44*, *CD24* y *ALDH1*) y marcadores de la transición epitelio mesenquimal (EMT) (*CDH1*, *VIM*) después de la exposición a la CAAT-MC en comparación con las células TNBC no expuestas después de un período de 72 horas. Las condiciones de la PCR y las secuencias de cebado se describen en "Material y métodos". Los resultados mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Prueba t-student: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001 \pm ES$ .

## 6.6. LAS AdMSC<sup>TNBC</sup> PROMUEVEN LA TUMORIGÉNESIS Y LA CAPACIDAD DE INVASIÓN EN LAS TNBC

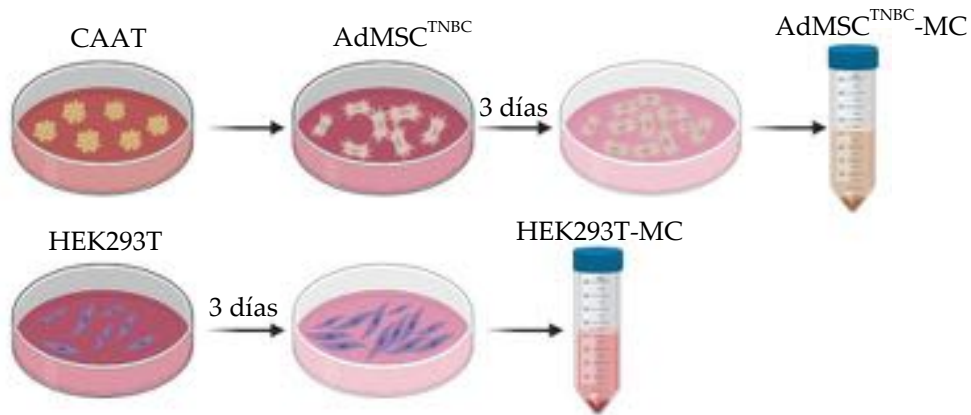
Como hemos mencionado en la introducción, entre las poblaciones celulares que encontramos dentro del CAAT se encuentran las MSC. Las MSC son células estromales multipotentes con capacidad de autorenovación y diferenciación a adipocitos, condrocitos, y linajes óseos y miogénicos, que destacan por su interacción con las células tumorales (D'souza et al., 2013; Cardenas et al., 2016). Además, secretan factores antiapoptóticos, angiogénicos, de crecimiento, y tienen capacidades quimio-atractivas sobre las células asociadas al tumor (Bertolini et al., 2012; Glenn & Whartenby, 2014). Se puede aislar MSC de diversas procedencias en nuestro cuerpo huesos, cartílagos, grasa, músculos y pulpa dental, medula ósea, etc... (Ahn, 2020).

Las MSC asociadas al tumor (CA-MSC), también conocidas como MSC-tumor residentes, debido a la influencia del MT y la comunicación con el tumor, son diferentes de las AdMSC normales, y pueden modular la progresión del tumor y la sensibilidad a los fármacos. Mediante la secreción de factores solubles (SAF) al MT, las CA-MSC puede regular la angiogénesis, la invasión y la metástasis de los tumores mamarios. También cabe destacar la resistencia que presentan las mismas MSC a los agentes quimioterápicos (Velaei et al., 2016).

Para averiguar el papel de las CA-MSC de TNBC (AdMSC<sup>TNBC</sup>) como fuente de factores contenidos en el TNBC-TM, utilizamos CAAT de pacientes con TNBC, sin tratamiento quimioterápico previo a la cirugía. Las AdMSC<sup>TNBC</sup> se aislaron mediante la técnica de cultivo de explante y a partir de ellas se preparó el medio condicionado (AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC), que contenía el conjunto de factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>. Para asegurarnos que los resultados obtenidos a partir de células que han estado expuestas al medio condicionado durante varios días no ocurren como consecuencia del desgaste del medio, o por el medio de cultivo *per se*, sin factores secretados, decidimos llevar en paralelo un MC control preparado a partir de las células HEK293T (HEK293T-MC), una línea celular no tumoral ampliamente utilizada en investigación biomédica, y cuyo secretoma sabemos

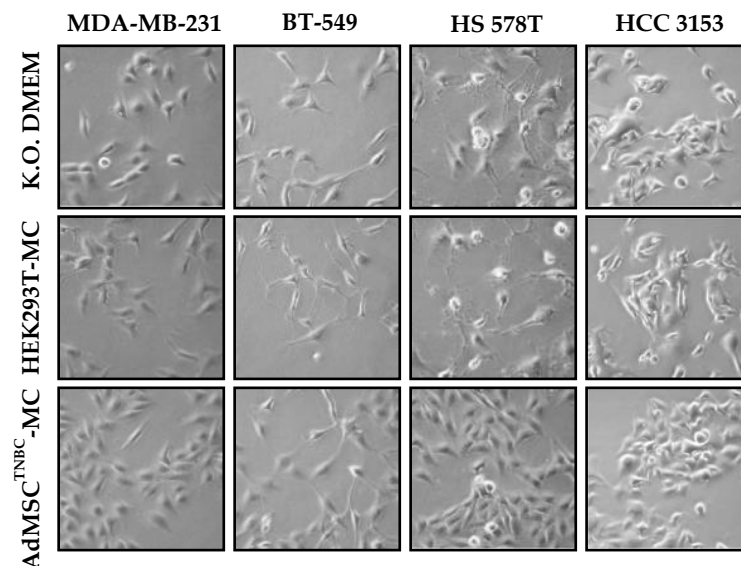


que no tiene ningún efecto sobre células cancerosas (Figura 38) (Galan-Moya et al., 2011; Guelte et al., 2012).



**Figura 38.** Preparación del HEK293T-MC y del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Las células se sembraron en una placa de 100mm. Al día siguiente, el medio se reemplazó por un medio completamente fresco (KO DMEM + FBS). Pasados 3 días, se recogió el MC, que fue filtrado a través de la membrana 0.22μm (Millipore), alicuotado y almacenado a -80°C hasta su uso.

La exposición de las células de TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153) a los SAF contenidos en el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC fue suficiente para estimular su crecimiento, de manera similar a lo que se había observado con el CAAT-MC (Figura 39).



**Figura 39.** Aumento del número de células TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T, y HCC3153) después de la exposición al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC durante 48 horas en comparación con las células TNBC que habían sido expuestas a HEK293T-MC o KO DMEM.

Estos resultados no se consiguieron en las condiciones control (HEK293T-MC y medio fresco K.O. DMEM) (Figura 39).

Del mismo modo, tras analizar los niveles de expresión de los marcadores de *stemness* y EMT evaluados anteriormente en respuesta a CAAT-MC, se encontró un aumento de *CD44*, *CD24*, *ALDH1A* y *VIM*, así como una disminución de la expresión de *CDH1* al exponer las células de MDA-MB-231 al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC (Figura 40) indicativo de una ganancia de propiedades similares a las CSC; aumento de la proliferación celular y la tumorigénesis, mayor capacidad de migración y metástasis tumoral y a su vez la adquisición de un estado más indiferenciado de la EMT.

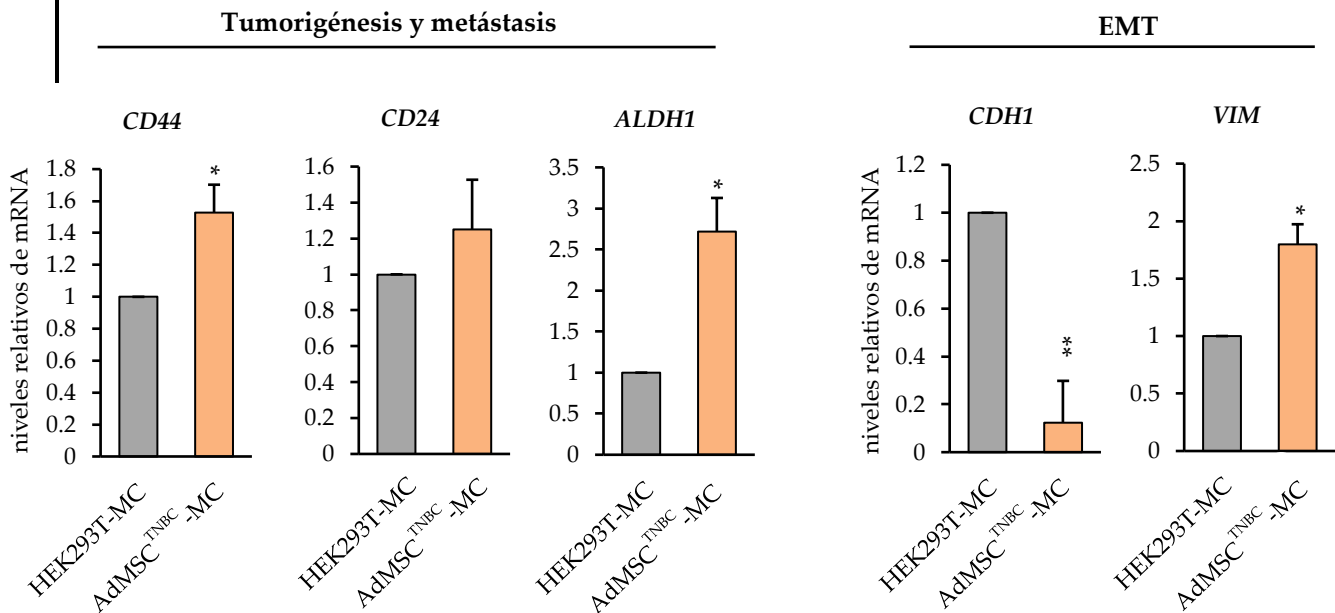
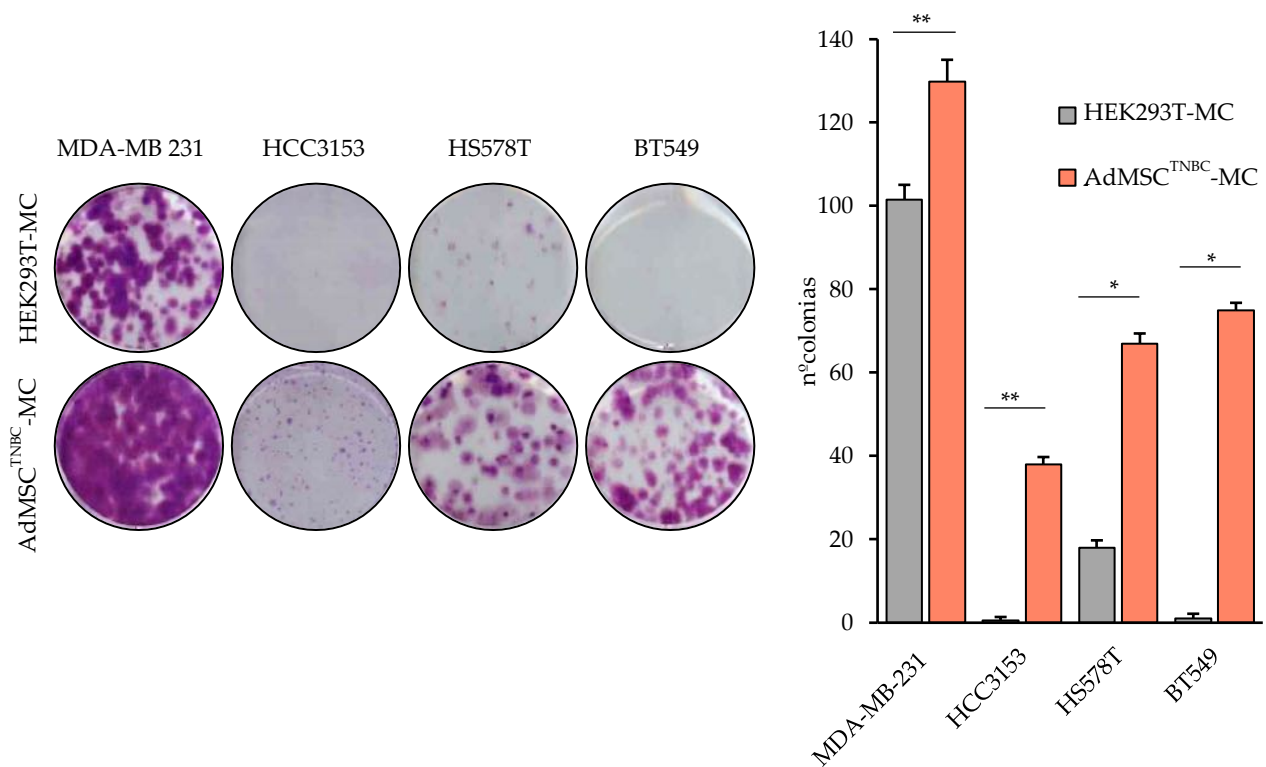


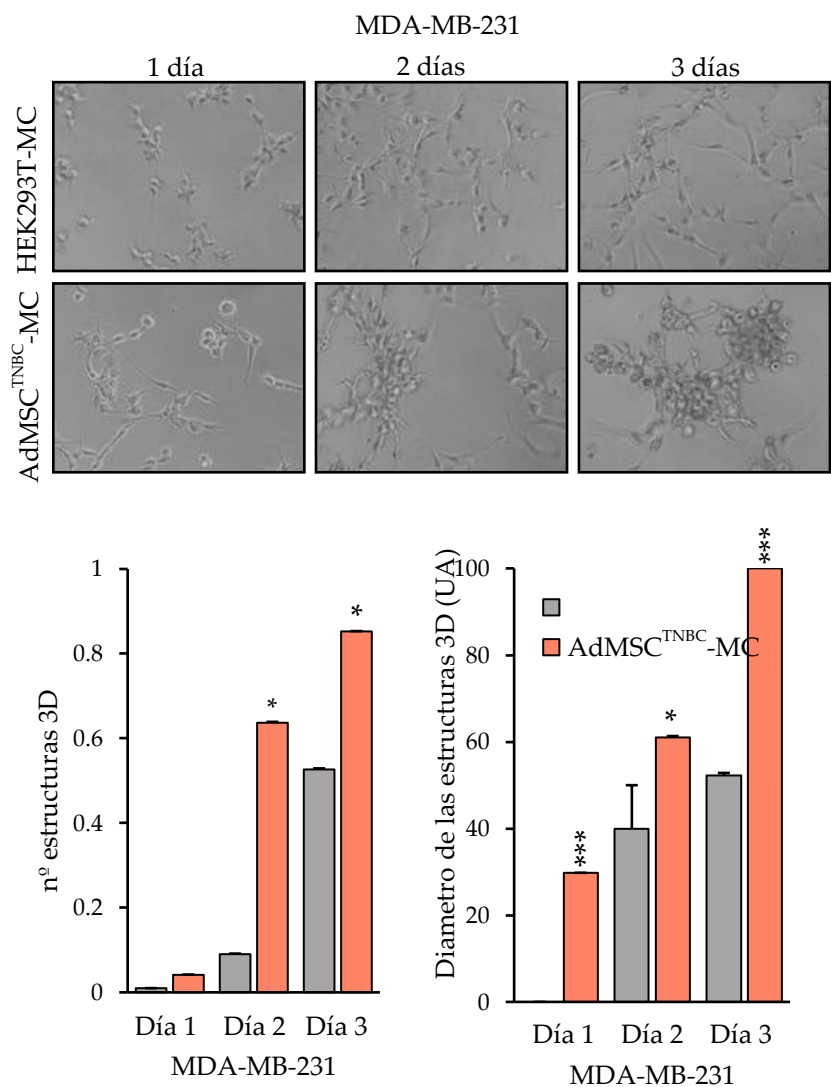
Figura 40. Las células MDA-MB-231 expuestas durante 48 horas al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC en comparación con el control (células MDA-MB-231 expuestas a HEK293T-MC) han aumentado los niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la tumorigénesis y metástasis (*CD44*, *CD24* y *ALDH1*) y la transición epitelial mesenquimal (EMT) (*CDH1*, *VIM*). Las condiciones de la PCR y las secuencias de los cebadores se describen en "Material y métodos".

Para evaluar el papel que los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> tienen en la iniciación tumoral, realizamos un ensayo *in vitro* de formación de colonias con las células MDA-MB-231, BT549, HS578T, y HCC3153 en presencia de AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Como se muestra en la figura, después de 10 días, las células expuestas al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC formaron un mayor número de colonias que las cultivadas en presencia de MC de control HEK293T-MC (Figura 41). Cabe destacar que, debido a la baja confluencia inicial que requiere este tipo de experimentos, la mayoría de las líneas celulares no pudieron formar colonias a menos que estuvieran en presencia de AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC, como HCC3153 y BT549, o formaron otras discretas, como en HS578T. La cuantificación de los resultados obtenidos demostró que el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC aumentaba de manera significativa la capacidad de formar colonias, lo que indicaría que las AdMSC tienen un efecto positivo sobre la capacidad de iniciación tumoral.



**Figura 41.** El AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC aumenta la capacidad de iniciación tumoral en el TNBC. Las células TNBC se sembraron (500 células/pocillo en una placa de 6 pocillos) y después de 24 horas, se reemplazó su medio por HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Después de un período de incubación con los MC de 10 días, las colonias formadas fueron fijadas y teñidas usando la técnica del cristal violeta para evaluar la capacidad de iniciación del tumor. El número de colonias fue cuantificado usando ImageJ.

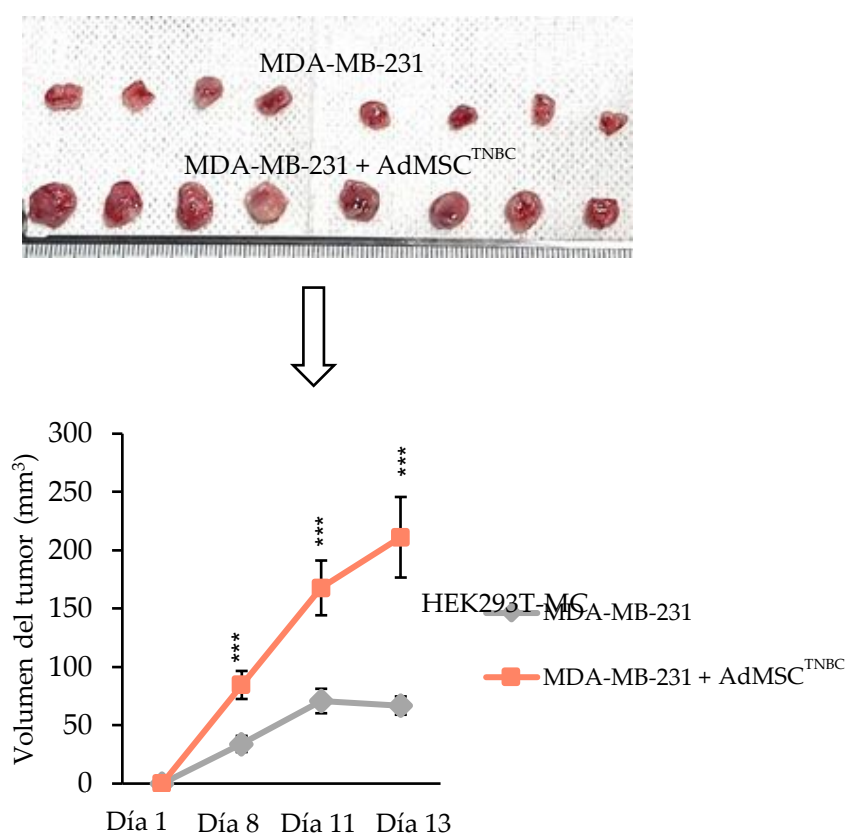
A continuación, para explorar la implicación de las AdMSC en la capacidad de invasión de TNBC, estudiamos el efecto del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC sobre las células MDA-MB-231 embebidas en una matriz de matrigel semisólida. Curiosamente, la capacidad de invasión de las células MDA-MB-231 observada después de 72 horas de cultivo en la condición control (HEK293T-MC) se alcanzó en sólo 24 horas de exposición al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC, como se refleja en el aumento de la longitud de las ramas formadas. Y lo que es más sorprendente, el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC indujo la formación de estructuras tridimensionales complejas, que no se encontraron en los cultivos semisólidos de control (*Figura 42*)



**Figura 42.** Los factores secretados por el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC promueven el crecimiento del tumor aumentando su capacidad de invasión 3D. Las células MDA-MB-231 fueron depositadas en una matriz de matrigel. 24 horas más tarde, las células fueron incubadas con HEK-293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. La formación de estructuras 3D fue monitoreada durante los siguientes 3 días para evaluar el crecimiento del tumor y la capacidad de invasión. Se muestra una imagen representativa de uno de los 3 experimentos. Las fotografías fueron tomadas por el microscopio óptico invertido, 20X. El número de estructuras 3D y su diámetro fue cuantificado usando ImageJ.

indicativos de un mayor crecimiento del tumor y capacidad de progresión tumoral por parte de las células.

Para completar este primer set de experimentos, exploramos la contribución de los factores secretados por las AdMSC a la iniciación del tumor *in vivo*. La co-inyección de células MDA-MB-231 con células AdMSC<sup>TNBC</sup> en la línea mamaria de los ratones (ratio 3:1) redujo el tiempo de iniciación tumoral y produjo tumores de mayor tamaño (Figura 43), lo que sugiere que esta población de células del tejido adiposo son un actor clave en la tumorigénesis. Para asegurarnos de que las diferencias observadas no eran provocadas



**Figura 43.** El secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> condujo a una reducción del tiempo de iniciación del tumor y a un mayor tamaño de este. Para evaluar *in vivo* el impacto que el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> tuvo en el crecimiento del tumor, se hicieron estudios de xenoinjertos. Inicialmente se establecieron dos condiciones, en la primera inyectamos de forma s.c  $2 \times 10^6$  de MDA-MB-231 ( $n=4$ ), y en la segunda  $1,5 \times 10^6$  células MDA-MB-231 +  $0,5 \times 10^6$  células de AdMSC<sup>TNBC</sup> ( $n=4$ ) en la línea mamaria de los ratones de forma aleatoria. Una vez los tumores empezaron a crecer se fueron realizando medidas hasta que se pudo observar claramente el aumento del crecimiento del tumor. Los diámetros de los tumores fueron medidos en serie usando la siguiente fórmula:  $V = (L \times W^2) / 2$ , donde  $V =$  volumen ( $mm^3$ ),  $L =$  longitud ( $mm$ ) y  $W =$  anchura ( $mm$ ). El test de t-Student se utilizó para calcular la significación estadística, valor  $p^* \leq 0.05$ ,  $** \leq 0.01$ ,  $*** \leq 0.001$ . Se representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos.

por la inyección de AdMSC<sup>TNBC</sup> *per se*, inyectamos estas células por separado, no observando ningún crecimiento tumoral en los animales (dato no mostrado).

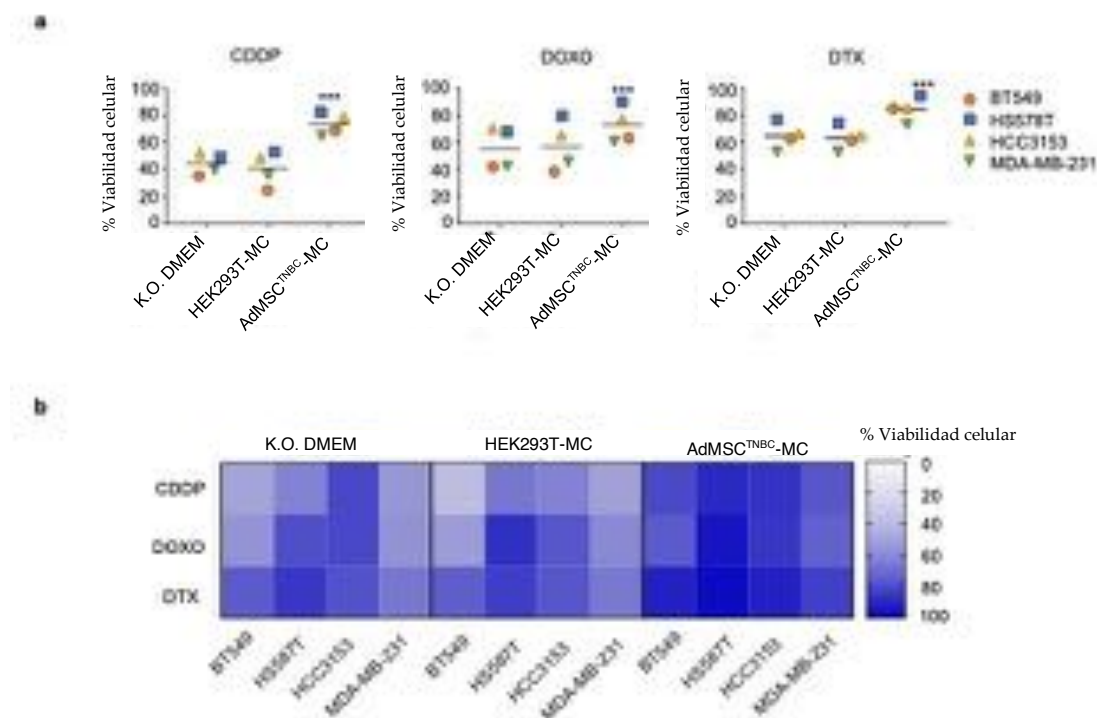
El MC preparado a partir de AdMSC<sup>TNBC</sup> derivadas de CAAT de pacientes con TNBC mediante la técnica de cultivo de explante aumentó los marcadores de tumorigénesis y desplazó la EMT hacia un estado celular más indiferenciado (mesenquimal), de forma similar al CAAT-MC. Pero, mientras la ratio *CD44/CD24* en las células de MDA-MB-231 expuestas al CAAT-MC era de 4,65 y los niveles de expresión relativa de *ALDH1* eran de 60,43, las células expuestas al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC presentaban un menor ratio *CD44/CD24* =1,22 al igual que un menor nivel de *ALDH1*=2,72. En cambio, cuando analizamos los niveles de *VIM* las células expuestas al CAAT-MC tenían niveles de expresión relativa de ARNm de 1,33 y de 1,78 en presencia de los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>. En vista a los resultados obtenidos el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC parece desempeñar un papel más importante en la EMT que en la *stemness*. Estas diferencias podrían ser debidas a los diferentes SAF contenidos en el MC preparado a partir de ambas condiciones. Mientras el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC únicamente contiene los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>, el CAAT-MC contiene los SAF secretados por todas las poblaciones celulares contenidas en el tejido adiposo peritumoral, como son los adipocitos y las células endoteliales, entre otros (Diaz Bessone et al., 2019). Aun así, nuestros resultados sugieren que los factores secretados procedentes de las AdMSC<sup>TNBC</sup> podrían ser suficientes para recapitular el efecto del secretoma del microambiente adiposo tumoral.

De hecho, las AdMSC<sup>TNBC</sup>, a través de sus factores secretados, aumentaron la capacidad de iniciación tumoral y crecimiento del tumor aumentando la capacidad de invasión de la matriz en las células TNBC, y la coinyección de estas células en un modelo de xenoinjertos de TNBC aceleró la aparición del tumor y generó tumores de mayor tamaño, demostrando que el AdMSC tiene un papel en la iniciación del tumor también *in vivo*.

## 6.7. LOS FACTORES SECRETADOS POR LAS AdMSC<sup>TNBC</sup> PROTEGEN A LAS CÉLULAS DE TNBC FRENTE A TRATAMIENTOS QUIMIOTERÁPICOS

Los pacientes con cáncer de mama generalmente experimentan una disminución en la respuesta al tratamiento debido, entre otras causas, al papel de los factores secretados por el MT (Velaei et al., 2016). Es por ello por lo que nos propusimos evaluar qué rol tienen los factores secretados, concretamente por las AdMSC<sup>TNBC</sup>, en la respuesta a tres agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados en el tratamiento del TNBC, como el cisplatino (CDDP), la doxorubicina (DOXO) y el docetaxel (DTX). Para llevar a cabo este estudio, las células de TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153) fueron preincubadas con AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC o los medios de control (K.O. DMEM y HEK293T-MC) antes de la exposición a las dosis indicadas de los fármacos (*Figura 44*). Nuestros resultados revelaron que las células preincubadas con el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> mostraban una mayor resistencia a la droga, lo que conllevaba un menor impacto sobre la disminución de la viabilidad celular, comparadas con las células expuestas a los otros dos medios (K.O. DMEM, y HEK293T-MC) (*Figura 44 a*). Como se observa en el mapa de calor (*Figura 44b*) realizado a partir de los datos obtenidos en la *figura 44a*, los cuadrantes correspondientes con las cuatro líneas celulares preincubadas con el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC antes de la exposición a las drogas se muestran de color azul más oscuro. Este resultado apunta a que las MDA-MB-231 cultivadas en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC (cuadrantes azules oscuros) se encuentran, en cierta manera, protegidas frente a la acción del fármaco. Esto no se visualiza en las otras dos condiciones donde los colores predominantes son el azul claro y el blanco. Los SAF contenidos en el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC confieren, por tanto, cierta quimioresistencia a las células MDA-MB-231 frente a CDDP, DOXO y DTX.





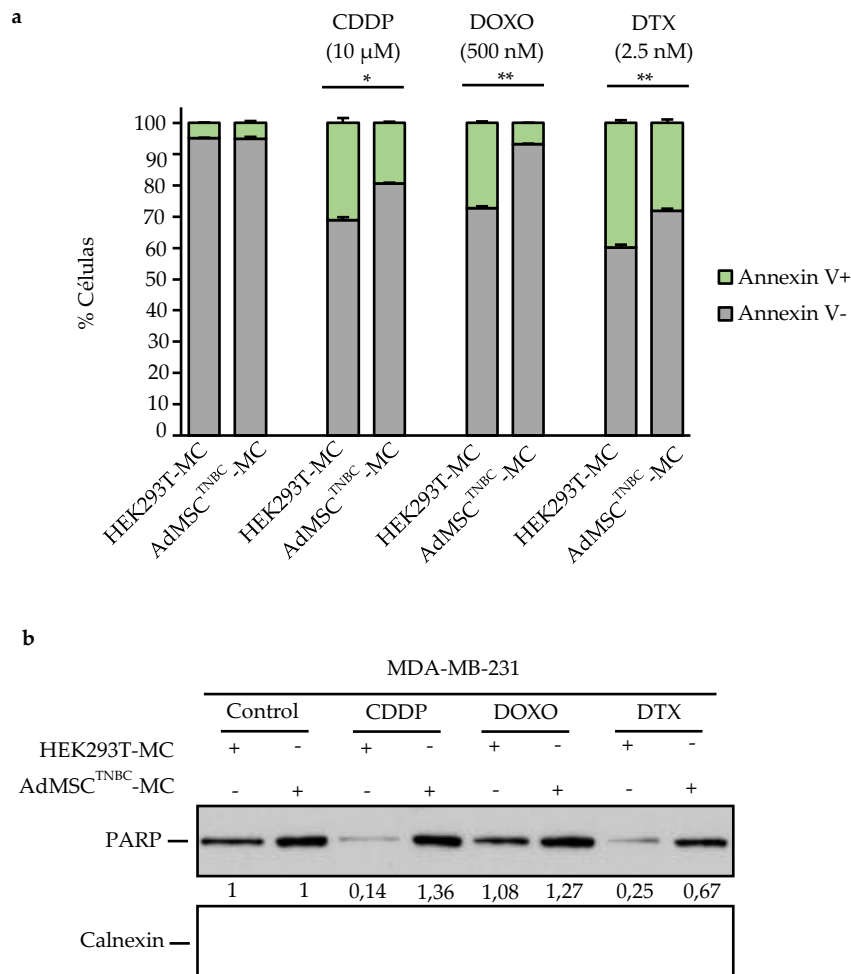
**Figura 44:** El secretoma de las AdMSC produce una disminución del impacto del agente quimioterapéutico sobre la viabilidad celular en MDA-MB-231, HCC3153, HS578T y BT549. a) Las células MDA-MB-231, HCC3153, HS578T y BT549 fueron tratadas durante 48 horas con CDDP (10  $\mu$ M), DOXO (500 nM) y DTX (2,5 nM) en presencia de K.O. DMEM, HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Después del tratamiento, el porcentaje de células viables se evaluó mediante un ensayo de MTT. El gráfico muestra el porcentaje de células viables para las cuatro líneas de TNBC después del tratamiento con los fármacos para las tres condiciones. b) El mapa de calor se obtuvo a partir de los valores anteriores. Los valores en azul oscuro indican un mayor porcentaje de viabilidad celular, mientras que los cuadrantes con colores más cercanos al blanco tienen menor viabilidad celular.

Para investigar que efecto producen los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> en la muerte celular mediada por quimioterapia, llevamos a cabo un estudio mediante citometría de flujo y evaluamos la apoptosis inducida por los compuestos en nuestro modelo de MT tumoral *in vitro*. Nuestros resultados mostraron cómo se veía afectada la muerte celular en células MDA-MB-231 expuestas durante 48h a CDDP (10 $\mu$ M), DOXO (500nM) y DTX (2,5nM) previa incubación con los medios condicionados (HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC).

Tras finalizar el tratamiento, el análisis de incorporación de anexina V (AnV), proteína con gran afinidad por los fosfolípidos de membrana celular que se une solamente a las células



cuando se encuentran en estado apoptótico, reveló que los tres compuestos quimioterápicos indujeron una marcada apoptosis en las células control preincubadas con HEK293T-MC (*Figura 45a*), hecho que se correlacionó con una disminución en los niveles de PARP total (*Figura 45b*). Sin embargo, la apoptosis mediada por estos fármacos fue significativamente menor en MDA-MB-231 preincubadas con el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC, permaneciendo los niveles totales de PARP similares a los de las células no tratadas, lo que apoya la teoría de que los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> dotan a las células tumorales, que se encuentran interaccionado con ellos en su mismo microambiente tumoral, de una mayor resistencia a la droga. Este resultado está en línea con trabajos realizados por otros grupos en otros tipos tumorales y con MSC de origen no adiposo, como el de He y colaboradores, donde MSC procedentes de médula ósea promueven la resistencia a la quimioterapia en cáncer gástrico (He et al., 2019) o Castells y colaboradores, que muestra como las MSC procedentes de la medula ósea también inducen una disminución de la muerte celular mediada por apoptosis tras el tratamiento con quimioterápicos en cáncer de ovario (Castells et al., 2013). Sin embargo, esta es la primera vez que se tienen evidencias de que esto sucede gracias a las AdMSC<sup>TNBC</sup> en pacientes con TNBC.



**Figura 45.** El secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> bloquea el efecto inhibitorio de los tres agentes quimioterapéuticos sobre la muerte celular en MDA-MB-231, HCC3153, HS578T y BT549. a) El MDA-MB-231 se incubó durante 48 horas con agentes quimioterapéuticos (CDDP 10μM, DOXO 500nM, DTX 2.5nM) en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Después de ese tiempo, las células fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la población positiva para AnV (Annexin V +). Se representa la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes, valor  $p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ . b) Los niveles de proteína de PARP y calnexina presentes en la línea celular MDA-MB-231 que fue tratada con los agentes quimioterapéuticos (CDDP 10μM, DOXO 500nM, DTX 2.5nM) en presencia del medio acondicionado de HEK293T y AdMSCTNBC durante 48 horas fueron evaluados por el análisis Western blot.

## 6.8. LOS FACTORES QUE EMANAN DE LAS AdMSC<sup>TNBC</sup> TIENEN UN PAPEL EN LA RECURRENCIA DEL TUMOR Y LA CAPACIDAD DE METÁSTASIS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA

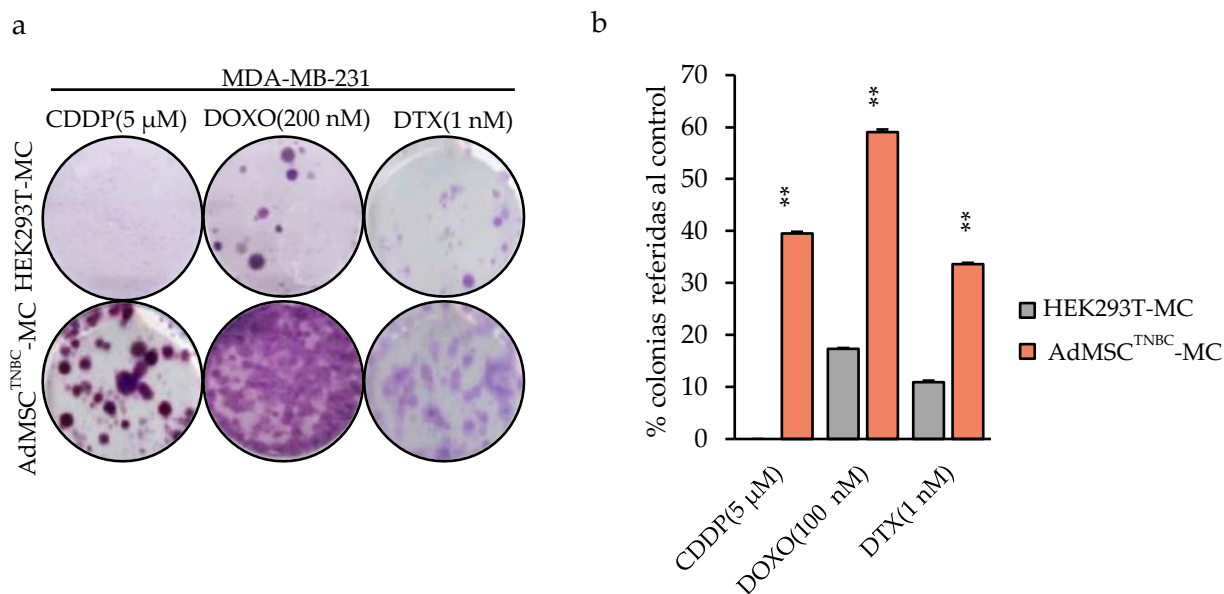
Para investigar si el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> juega un papel en la recurrencia del tumor tras un tratamiento con quimioterapia, realizamos ensayos de formación de colonias en las células MDA-MB-231 expuestas al tratamiento (CDDP, DOXO y DTX) durante 24h en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Como se muestra, mientras que los tres agentes impidieron de manera casi completa la formación de colonias en MDA-MB-231 en presencia de HEK293T-MC durante el tratamiento, la incubación con AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC provocó un efecto protector y las células incubadas con este MC fueron afectadas en menor medida, manteniendo la capacidad de formación de colonias después del tratamiento (*Figura 46*).

Como se observa en la figura, las MDA-MB-231 expuestas a CDDP en presencia HEK293T-MC no son capaces de formar colonias. Los “puntitos” observados corresponden a células que han conseguido sobrevivir al tratamiento con CDDP pero que no han sido capaces de dividirse hasta formar una colonia tras 10 días de cultivo. Sin embargo, los SAF de las AdMSC<sup>TNBC</sup> son capaces de revertir este efecto parcialmente, protegiendo a las células frente al efecto del quimioterápico.

Las células expuestas a DOXO e incubadas con HEK293T-MC, sin embargo, si son capaces de formar algunas colonias. Esto es indicativo de que algunas células MDA-MB-231 presentaban resistencia intrínseca a la DOXO y por tanto pudieron dividirse. Aun así, las MDA-MB-231 tratadas con DOXO e incubadas con AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC presentan una capacidad aún mayor de formar colonias.

Tras el tratamiento con DTX también se observó una mayor capacidad recidiva en las MDA-MB-231 incubadas con los SAF de las AdMSC<sup>TNBC</sup>.

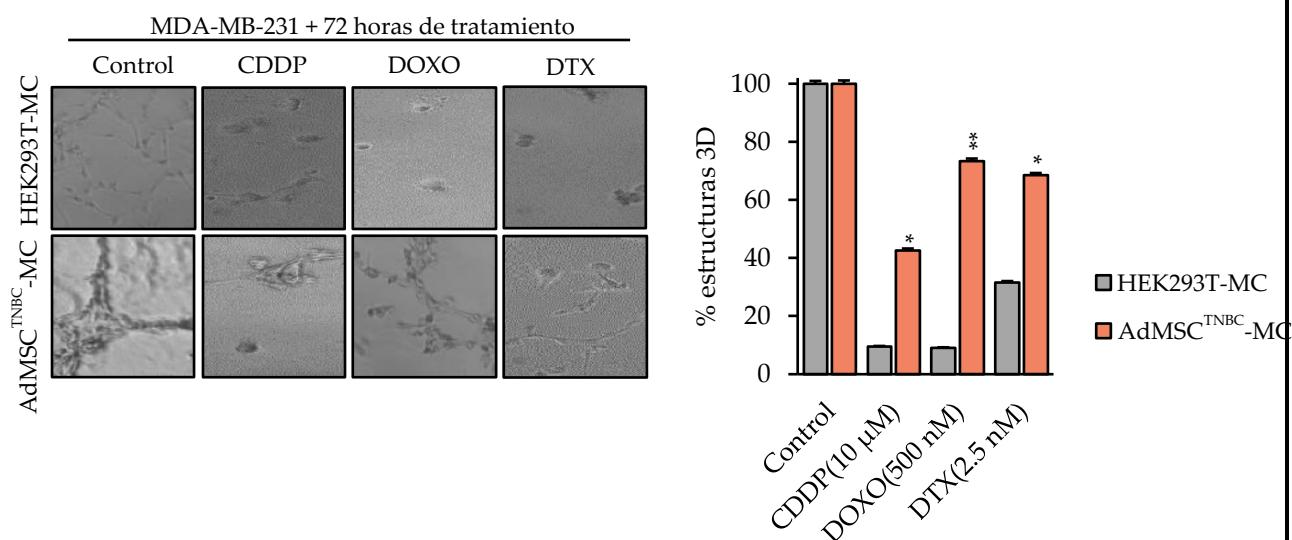
Estos resultados apuntan a que el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> podría tener un papel determinante en las recidivas de los TNBC.



**Figura 46:** Los SAF por las AdMSC<sup>TNBC</sup> bloquean el efecto inhibitorio de los agentes quimioterápicos sobre la capacidad de metastásis de las células MDA-MB-231. Ensayo de clonogénicos en la línea de TNBC MDA-MB-231 tratada con tres quimioterápicos diferentes (CDDP 5μM, DOXO 200nM, y DTX 1nM) en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC a una densidad celular de 5.000 células/pocillo. Las colonias se encuentran fijadas y teñidas mediante la técnica de cristal violeta. a) Imagen cualitativa representativa de 3 experimentos; b) Cuantificación del número de colonias presentes por ImageJ. Se representa la media media±SD de tres experimentos, P-valor ≤0.01 \*\*, ≤0.001 \*\*\*.

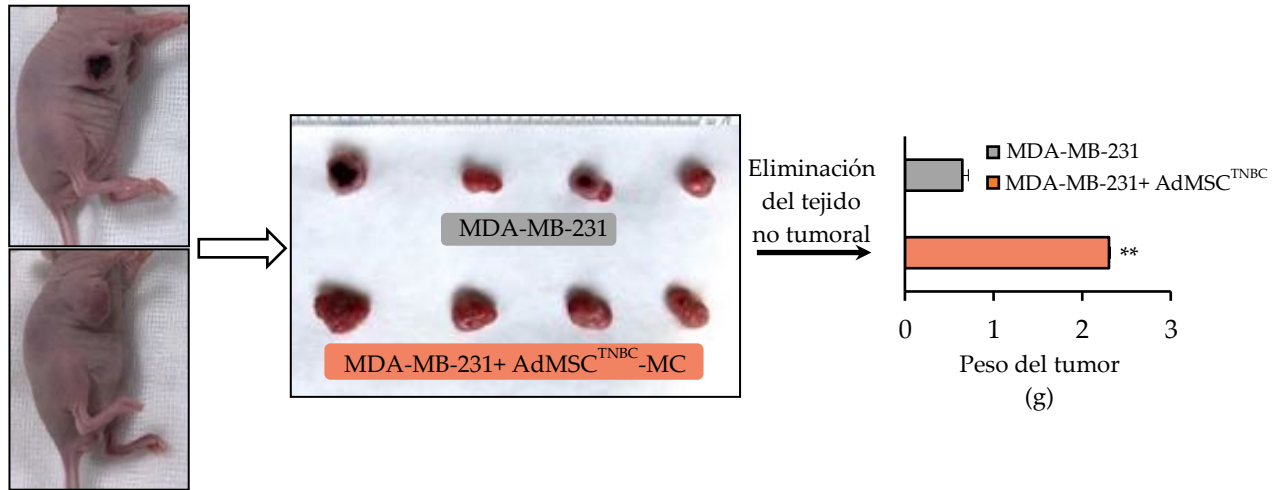
A continuación, evaluamos el efecto de los factores derivados de AdMSC<sup>TNBC</sup> sobre la capacidad de metástasis que se puede producir tras quimioterapia. Para ello, se realizaron estudios de invasión en los que las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en una matriz semisólida de matrigel, que imita la membrana basal, para favorecer la formación de estructuras 3D. De nuevo, las células fueron preincubadas con AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC o con HEK293T-MC antes de la exposición a los tres agentes quimioterapéuticos. Estos MC fueron mantenidos durante toda la duración del experimento. 72 horas después de la exposición a los fármacos, las células que se encontraban en presencia del medio control y expuestas a los agentes quimioterapéuticos no fueron capaces de formar dichas estructuras 3D. Por el contrario, las MDA-MB-231 que estaban expuestas a CDDP, DOXO y DTX en presencia de los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> conservaron, al menos parcialmente, su capacidad de invasión y de formación de estructuras 3D (Figura 47). Esto

es indicativo de que los SAF del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC bloquean en parte el efecto inhibitorio producido por los tratamientos favoreciendo la capacidad metastásica post-tratamiento.



**Figura 47:** El secretoma contenido en el AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC bloquea el efecto inhibitorio de los tres agentes quimioterapéuticos aumentando así la capacidad de crecimiento e invasividad tumoral en MDA-MB-231. Ensayo de formación de esferas en 3D en Matrigel. Las células MDA-MB-231 fueron incubadas durante 72 horas con tres agentes quimioterapéuticos (CDDP 10μM, DOXO 500nM, DTX 2.5nM) en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. A) Esta figura muestra las imágenes más representativas de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado, obtenidas por microscopía óptica (20x) B) Cuantificación de las imágenes obtenidas por la imagen J. Se representa la media ± SD de tres experimentos, valor  $p \leq 0.05$ ,  $** \leq 0.01$ .

Para evaluar si esta protección frente a la quimioterapia inducida por los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> ocurre también *in vivo*, adaptamos los modelos ortotópicos de la Figura 43 y testamos el efecto de uno de los compuestos, el cisplatino. Para ello, células de TNBC MDA-MB-231 se inyectaron ortotópicamente en ratones desnudos solas o junto con las AdMSC<sup>TNBC</sup> (ratio 3:1). El tratamiento con cisplatino se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen dado (150mm<sup>3</sup>) en ambos grupos. Aunque en ambos grupos se observó inicialmente una ligera disminución del tamaño del tumor tras la primera exposición al fármaco, los tumores coinyectados con AdMSC<sup>TNBC</sup> se recuperaron rápidamente y siguieron creciendo, duplicando su volumen en menos de 10 días a pesar del tratamiento con el quimioterápico, mientras que el crecimiento del tumor en el grupo de control se detuvo en respuesta a la quimioterapia (Figura 48).



**Figura 48:** Los SAF de las AdMSC<sup>TNBC</sup> amortiguan el efecto producido por el CDDP en un modelo in vivo permitiendo el crecimiento del tumor. La acción quimiorresistente de las AdMSC<sup>TNBC</sup> al CDDP se evaluó in vivo mediante estudios de xenoinjerto. Para ello se inyectaron al azar de forma s.c  $2 \times 10^6$  de MDA-MB-231 ( $n=4$ ), y en la segunda  $1,5 \times 10^6$  células MDA-MB-231 +  $0,5 \times 10^6$  células de AdMSC<sup>TNBC</sup> ( $n=4$ ) en la línea mamaria ratones desnudos de balb/c. Dos semanas después, cuando los tumores habían crecido lo suficiente se trataron los dos grupos con cisplatino 3mg/kg durante dos semanas más. Los ratones fueron monitoreados diariamente. Finalmente, los tumores fueron pesados. La representa la media  $\pm$  SD. Valor  $p \leq 0.01$  \*\*.

En conjunto, estos datos sugieren que el secretoma de las AdMSC podría estar actuando como un amortiguador del tratamiento para las células tumorales. Estos factores podrían ser responsables de suavizar el efecto de la quimioterapia activando vías de señalización celular en las células tumorales.

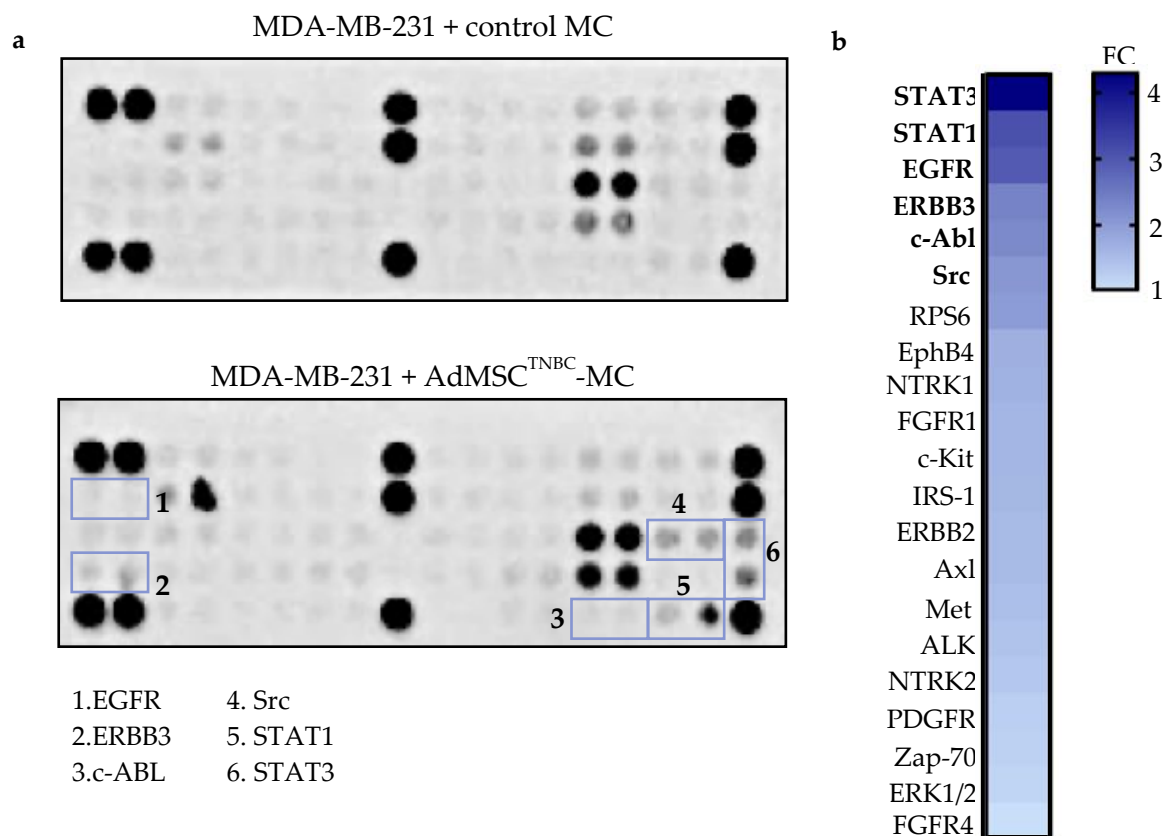
## 6.9. LAS AdMSC ACTIVAN EN LAS CÉLULAS DE TNBC UNA RED SEÑALIZACIÓN CENTRADA EN SRC

Como hemos visto hasta ahora, el AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM es capaz de favorecer la tumorigénesis y la capacidad de invasión tumoral en células de TNBC. Además, los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> bloquean el efecto inhibitorio de los agentes quimioterapéuticos en

TNBC; disminuyendo la muerte celular y aumentando la aparición de metástasis durante el tratamiento y de recidiva tras él.

La resistencia a la terapia es uno de los principales obstáculos en el tratamiento del TNBC. Comprender el mecanismo molecular por el que el AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM media este efecto en las células de TNBC sería el primer paso para superarla. Por ello, las células MDA-MB-231 fueron de nuevo expuestas a los medios condicionados que contenían los factores secretados por las células AdMSC<sup>TNBC</sup>. Tras 48 horas de incubación, se analizó el perfil de fosforilación de 28 RTK y 11 nodos de señalización importantes en señalización oncológica mediante el kit "PathScan RTK Signaling Antibody Array Kit" (# 7982, Cell Signaling Technology).

Los resultados revelaron 22 proteínas fosforiladas en respuesta a factores secretados por la AdMSC<sup>TNBC</sup>. Entre las proteínas alteradas, EGFR, Src, c-Abl, ERBB3, STAT1 y STAT3 mostraron el mayor incremento de fosforilación, con un aumento de al menos dos veces con respecto al control (Fold change > 2) (*Figura 49a*).



**Figura 49:** 22 proteínas se encuentran fosforiladas en las MDA-MB-231 en respuesta al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Las células MDA-MB-231 fueron sembradas a una densidad de 300.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente se trataron con los medios acondicionados de HEK293T (control) y AdMSC<sup>TNBC</sup>. 48 horas después, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en tampón de lisis frío (Cell Signaling). Se utilizó 150ug de la concentración de proteínas de cada una de las muestras para compararlas mediante el PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Chemiluminescent Readout) (Cell Signaling) para extraer la proteína de las muestras. Se revelaron las membranas, y los resultados fueron calculados por ImageJ. Se muestran las membranas del array (a) y el mapa de calor de los FC (b) de las 22 proteínas fosforiladas en respuesta a factores secretados por la AdMSC<sup>TNBC</sup> (referido a control). Las 6 proteínas fosforiladas al menos dos veces más que el resto en respuesta al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC las vemos resaltadas por un rectángulo azul en las membranas de los arrays y en negrita en el mapa

Con el fin último de desarrollar terapias más dirigidas y efectivas que puedan revertir el efecto protector proporcionado por el MT, quisimos comprender la interacción existente entre las 22 proteínas identificadas que se encontraban amplificadas (FC <2) en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM. Para poder averiguar cuáles de las proteínas son las más importantes dentro de la red, es decir, aquellas que presentan un mayor número de interacciones con

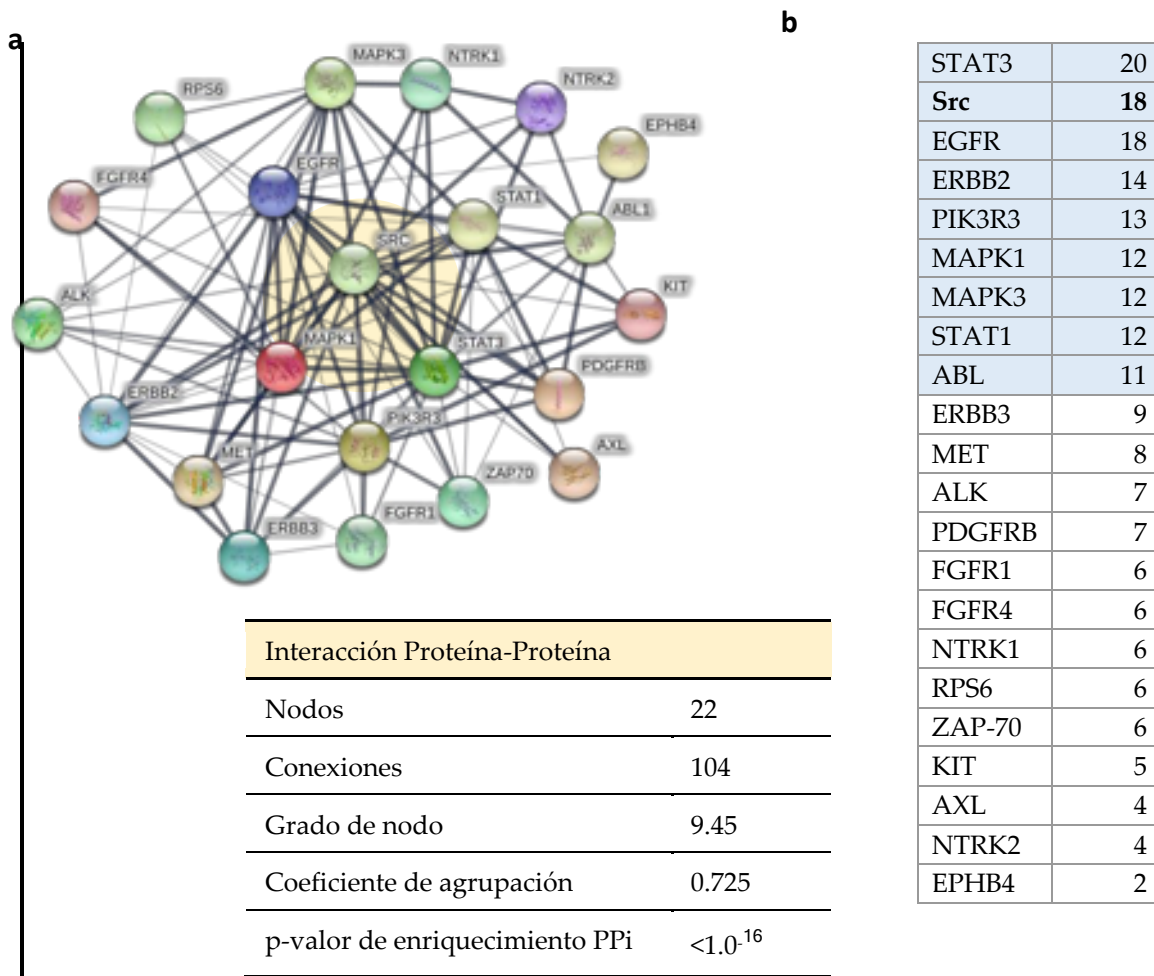


el resto de nodos, utilizamos las proteínas identificadas para construir un mapa de interacción proteína-proteína (PPI, del inglés, *Protein-Protein Interaction*) a través de la herramienta online String (Figura 50).

La red resultante mostró un alto coeficiente de agrupación (0.725), indicativo de que las proteínas se encuentran interaccionando fuertemente unas con las otras. Así, las proteínas STAT3, Src, EGFR, ERBB2, PIK3R3, MAPK1, MAPK3, STAT1 y ABL son las que presentaban un más alto grado de interacción, mayor al número medio de interacciones por nodo (9,75), siendo, por tanto, las más relevantes para su integridad. De entre todas, STAT3 (20 interacciones), Src (18 interacciones), y EGFR (18 interacciones) serían, a priori, las mejores candidatas como diana terapéutica para revertir la resistencia producida a los tratamientos proporcionada por el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup>.

Puesto que Src está mediando la activación de varias de las proteínas con más interacciones, incluyendo a STAT3 (Belli et al., 2020; Bjorge et al., 2011; Eroles et al., 2012), y, por tanto, podría tener un papel crucial como pieza clave en la comunicación tumor-MT, decidimos evaluar el efecto de su inhibición farmacológica sobre el efecto protector proporcionado por el MT.

Proteína	Edges
----------	-------



**Figura 50: Src, como proteína central de la red de PPI de las proteínas amplificadas en respuesta al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC.** A) Red de interacción proteína-proteína (PPI) para los genes amplificadas que tenían un  $FC \leq 1$  ( $n = 22$ ) en respuesta al AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC (referido al control) fueron construidas usando la herramienta en línea STRING. Este mapa de PPI que posiciona a Src como proteína de nodo central, muestra un alto grado de interacción de las proteínas correspondientes (Grado medio de nodo: 9.45; Coeficiente de agrupación local medio: 0,725; p-valor de enriquecimiento de PPI:  $<1.0^{-16}$ ). B) Numero de interacciones que establece una proteína con las demás proteínas de la red. Siendo proteínas centrales aquellas que tienen un grado de nodo mayor de 9.45. Las proteínas centrales se

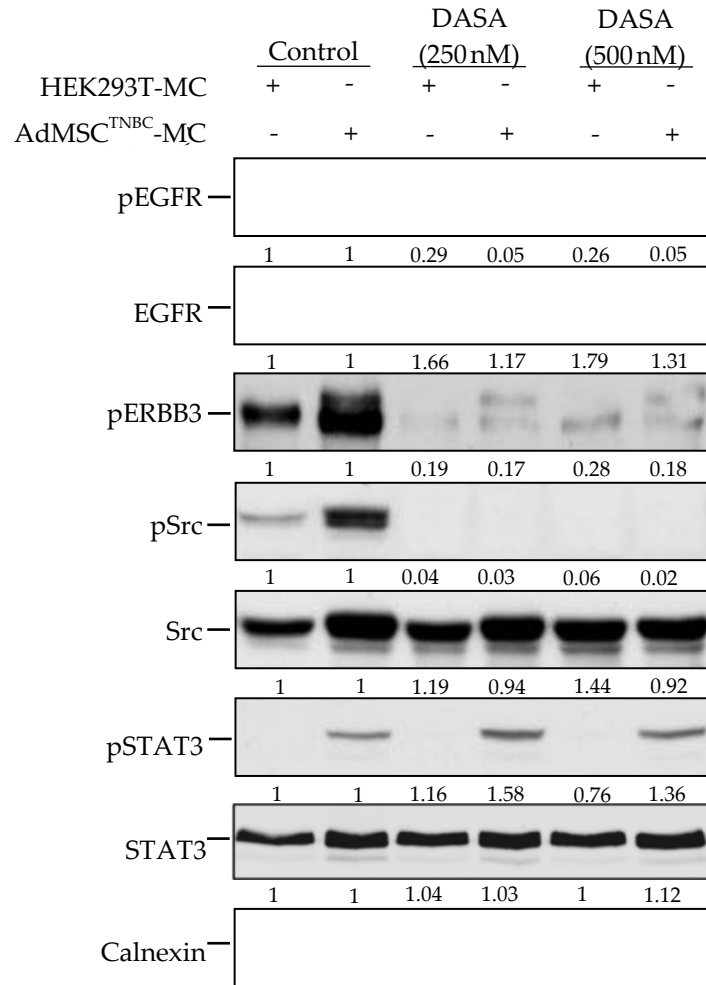
Existen diversos inhibidores específicos de Src; ENMD-2076, NVP-BHG712, KX2-391, Pelitinib, bosutinib, ponatinib, saracatinib y dasatinib (Tabla 5), siendo dasatinib y bosutinib, los que se encuentran en fase clínica 4 y, por tanto, los candidatos a ser empleados en esta tesis doctoral (Belli et al., 2020; Bristol-Myers Squibb, 2016; P O'Malley, 2020; Rivera-Torres & San José, 2019). En cambio, tras hacer una búsqueda exhaustiva de cual sería el mejor candidato de los dos para el tratamiento del TNBC, descubrimos que el bosutinib tenía poca o ninguna actividad inhibidora sobre la viabilidad/proliferación

celular con un IC 50 ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ), mientras que dasatinib inhibía de forma potente la proliferación de muchas líneas de células TNBC presentando valores de IC 50  $< 100 \text{ nM}$  (TARPLEY et al., 2014). Por este motivo el inhibidor que específico de Src que seleccionamos fue dasatinib.

*Tabla 5. Inhibidores específicos de las proteínas fosforiladas para los genes amplificados que tenían un FC $\leq 2$ .*

Proteína	FC	Inhibidores potenciales
Src	2,071	<b>Dasatinib</b> , bosutinib, ponatinib, nintedanib, bevacizumab
EGFR	2,225	<b>Dasatinib</b> , lapatinib, erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, tratuzumab, icotinib, afatinib, vandetanib, lidocaine, carboplatin, docetaxel, gemcitabine, irinotecan, paclitaxel, pertuzumab, fluorouracil, bevacizumab, HKI-272, necitumumab, bortezomib, capecitabine, cisplatin, doxorubicin, everolimun, oxaliplatin, topotecan, regorafenib, doxil, lomustine, pemetrexed, sirolimus, trametinib, vorinostat, ixabepilone
c-Abl	2,263	<b>Dasatinib</b> , nilotinib, imatinib, bosutinib, ponatinib, regorafenib
HER3/ErbB3	2,354	<b>Dasatinib</b> , Gefitinib
STAT1	3,089	Fludarabine, methimazole, niclosamide
STAT3	4,293	Ethambutol, isoiazid, pyrazinamide, rifampin, Streptomycin, amphotericin B, miconazole, niclosamide, Tremelimumab, SD 1008, Cucurbitacin I, Cryptotanshinone, FLLL32, HO-3867, Nifuroxazide, NSC 74859, SH-4-54, <b>Stattic</b> , WP1066

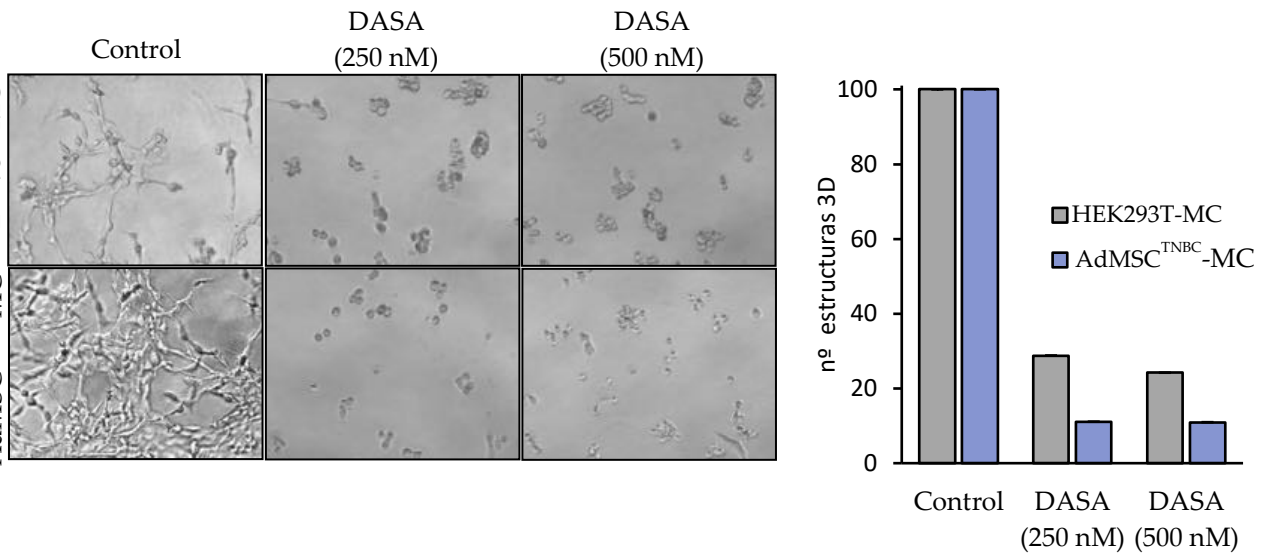
Para evaluar como afectaba este inhibidor a la actividad de las proteínas más relevantes de la red de interacción en las células de TNBC MDA-MB-231 en un contexto de MT, las células MDA-MB-231 fueron expuestas al dasatinib previa incubación con AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM o medio control. A pesar de los altos niveles de fosforilación exhibidos en presencia de los factores secretados por las AdMSC, el tratamiento con dasatinib suprimió completamente la fosforilación de Src (*Figura 51*). Además, también se observó un marcado efecto sobre las formas fosforiladas tanto de EGFR y como de ERBB3, mientras que este inhibidor de TK no afectó a los niveles de fosforilación de STAT3.



**Figura 51:** El tratamiento con Dasatinib suprimió la fosforilación de Src en la línea celular de TNBC MDA-MB-231. Niveles de proteína de pEGFR, EGFR, pERBB3, pSrc, Src, pSTAT3, STAT3 y calnexina presentes en la línea celular MDA-MB-231, que fue incubada con el medio condicionado de HEK293T y AdMSC<sup>TNBC</sup> seguido de un tratamiento con dasatinib (250 nM y 500 nM). Los niveles de proteína fueron evaluados por Western blot y se cuantificaron con la herramienta Image J.

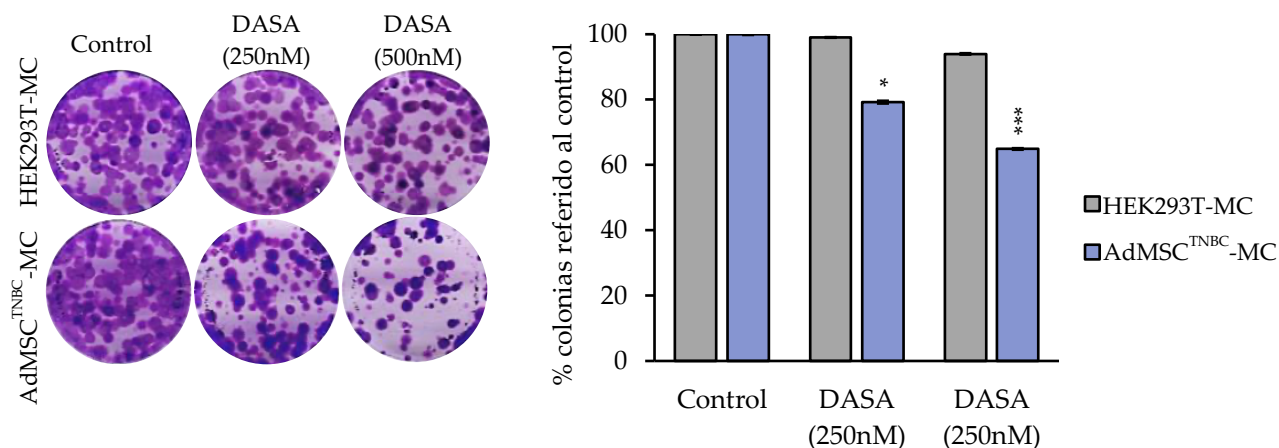
Para evaluar si el dasatinib podía bloquear el efecto positivo del CM sobre la invasión y la capacidad de iniciación de tumores de células de TNBC, se realizaron ensayos de invasión 3D en matrigel y clonogénicos en presencia del inhibidor usando un abordaje similar al de la Figura 47. Tras sembrar a las células MDA-MB-231 en una matriz de matrigel, las células se pretrataron con el CM de las AdMSC<sup>TNBC</sup> o el medio control, seguido del tratamiento con dasatinib. Al contrario de lo observado con los compuestos quimioterápicos, en los que la presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM actuó como una cama protectora, el inhibidor de Src dasatinib impidió de manera eficiente el fenotipo de migración 3D de MDA-MB-231 en

ambas condiciones, perjudicando completamente cualquier formación de estructura incluso en presencia de AdMSC-CM (*Figura 52*). Estos resultados serían indicativos de una disminución del potencial invasivo producido como consecuencia de la exposición a los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM. Estos factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> están activando rutas de señalización celular que aumentan la invasividad de las células tumorales pero el tratamiento con dasatinib hace que pierdan esta capacidad. Además, estudios preclínicos han demostrado que aunque la expresión de Src no se correlaciona con la sensibilidad de las líneas celulares de cáncer de mama a dasatinib, el estado de activación de la vía Src sí que podría hacerlo (Huang et al., 2007). Así, nuestros resultados apoyan que células TNBC con la vía oncogénica de Src activada, como ocurre en presencia de los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup>, pueden presentar mayor sensibilidad a agentes terapéuticos que se dirigen a componentes de esa vía, como es dasatinib. Además, otros autores destacan que dasatinib tiene un efecto antitumoral más potente en las células de cáncer de mama triple negativo que las de otros subtipos (Zhang et al., 2009; Kurebayashi et al., 2010), por lo que este inhibidor podría ser una diana terapéutica específica de TNBC, y por tanto un nuevo tratamiento dirigido no solo a atacar las células tumorales de TNBC sino a interrumpir la comunicación del MT con el tumor.



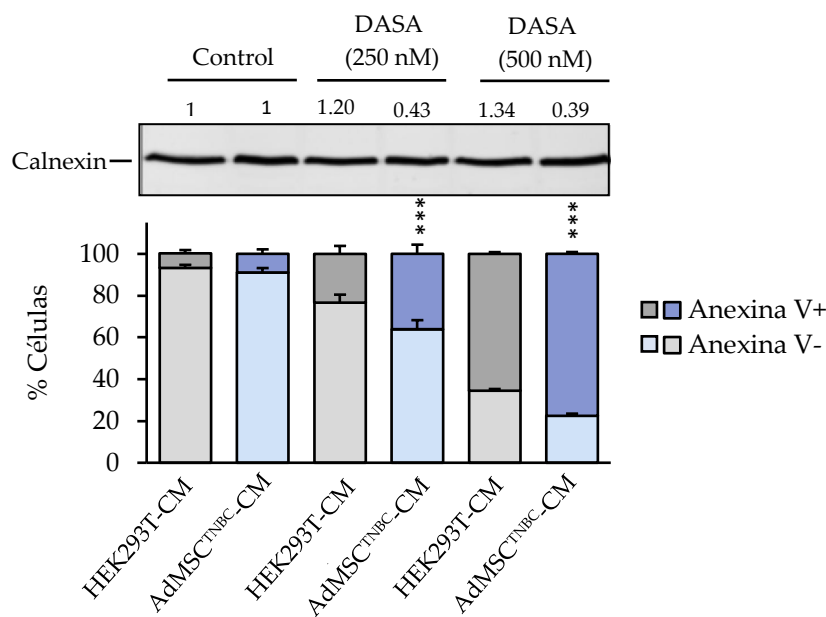
**Figura 52:** El inhibidor de Src Dasatinib impide el fenotipo de migración 3D de las MDA-MB-231 en ambas condiciones, siendo este efecto más potenciado en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Las células MDA-MB-231 o BT549 (5.000 células/pocillo en placas de 48 pocillos) se colocaron suavemente sobre una fina capa de matrigel. 24 horas más tarde, una vez las células estaban incorporadas en la matriz fueron incubadas en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC y expuestas a dasatinib (250nM o 500 nM). 72 horas después, se tomaron imágenes de las estructuras de invasión, y se evaluó el número de estructura 3D de cada condición. a) se muestra las imágenes más representativas de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado, obtenidas por microscopía óptica (20x) b) Cuantificación de las imágenes obtenidas por la imagen J. Se representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos, valor  $p$   $^* \leq 0.05$ ,  $^{**} \leq 0.01$ ,  $^{***} \leq 0.001$ .

De manera similar, cuando las MDA-MB-231 se pretrataron con el MC de las AdMSC<sup>TNBC</sup> o el medio control seguido del tratamiento con dasatinib, el inhibidor redujo la capacidad formación de colonias y, por tanto, su capacidad tumorigénica, siendo este efecto incluso más acuciado en presencia del secretoma AdMSC (Figura 53).



**Figura 53. El inhibidor de Src Dasatinib reduce la capacidad tumorigénica de las células MDA-MB-231 en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC.** Ensayo de formación de clonogénicos en la línea TNBC MDA-MB-231 tratada con dasatinib (250nM, 500nM) en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC a una densidad celular de 5.000 células/pocillo y mantenida en cultivo durante 10 días. Las colonias se fijaron y tiñeron mediante la técnica del cristal violeta. A) Imagen cualitativa representativa de al menos 3 experimentos. B) Cuantificación del porcentaje de colonias presentes referidas al control por ImageJ. Se representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos, *t*-student *p*-valor \* $\leq$ 0.05, \*\* $p\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001.

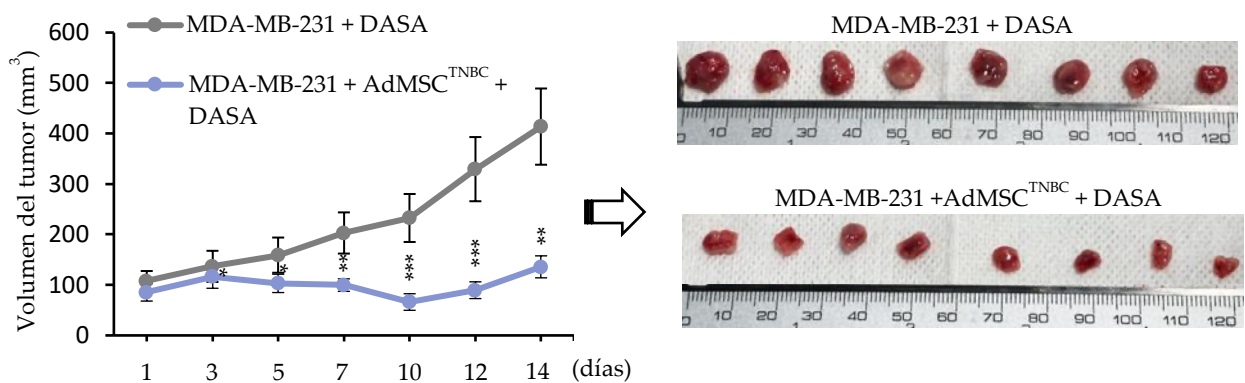
Como el secretoma de las AdMSC también puede actuar como un nicho protector de la apoptosis inducida por la quimioterapia estándar en células TNBC, seguidamente quisimos evaluar la muerte celular producida por el dasatinib en presencia de los factores secretados. Para ello, usando un abordaje similar al que realizamos en la figura 45, pero esta vez empleando el inhibidor dasatinib en lugar de los agentes quimioterápicos, evaluamos la respuesta mediante citometría de flujo. Como se observa en la figura 54 cuando las células recibieron además de un pretratamiento con los CM un tratamiento con dasatinib se observó un marcado aumento de la apoptosis de MDA-MB-231, siendo este efecto aún mayor en presencia de los SAF del nicho de AdMSC<sup>TNBC</sup>, lo que muestra diferencias significativas entre ambas condiciones.



**Figura 54:** El inhibidor de src Dasatinib potencia la muerte celular en un contexto de MT. Análisis por citometría de flujo del efecto del dasatinib para determinar la población positiva para la Anexina V (Anexina V+) en las MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se incubaron durante 48 horas con dasatinib en presencia de HEK293T-MC o AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC. Después de ese tiempo, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). El porcentaje de la población de células AnV+/AnV- se representó con un histograma. Se representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes, *t*-student *p*-valor  $\leq 0.05$ , \*\**p* $\leq 0.01$ , \*\*\**p* $\leq 0.001$ .

En conjunto, estos resultados sugirieron que el inhibidor de TK dasatinib podría tener un efecto más pronunciado en un contexto que recapitule mejor el microambiente adiposo del TNBC. Por tanto, para completar este set de experimentos, decidimos usar el modelo *in vivo* resistente a la quimioterapia validado en la figura 48 para evaluar el potencial antitumoral del dasatinib en este contexto protector mediado por el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup>. Como se muestra, el dasatinib, al contrario del tratamiento con cisplatino de la figura 48, ejerció un efecto mayor en el contexto de microambiente adiposo de TNBC, bloqueando completamente el crecimiento del tumor en presencia de AdMSC<sup>TNBC</sup> (Figura 55), lo que apoya los resultados *in vitro* anteriores en los que el MT activa la vía de Src en las células tumorales y, por tanto, éstas son más sensibles al efecto del dasatinib, reduciendo la capacidad tumorigénica e invasiva y potenciando la muerte celular.





**Figura 55: El bloqueo de Src revierte el nicho adiposo protector del tumor *in vivo*.** Se evaluó la inhibición de *src* mediante la acción del dasatinib en el modelo de nicho adiposo tumoral *in vivo*. Se inyectaron al azar  $2 \times 10^6$  células de MDA-MB-231 ( $n=4$ ) o  $1,5 \times 10^6$  células de MDA-MB-231 +  $0,5 \times 10^6$  células de AdMSC<sup>TNBC</sup> ( $n=4$ ) en la línea mamaria de los ratones. Dos semanas después, se trataron los dos grupos diariamente con dasatinib 10mg/kg durante dos semanas más. Los ratones fueron monitoreados diariamente. Finalmente, se pesaron los tumores. Se representa la media  $\pm$  SD, valor  $p^{**} \leq 0.01$ .

Así pues, el secretoma de las AdMSC<sup>TNBC</sup> parece estar actuando como un nicho de protección para el TNBC a través de la activación de una red centrada en el Src y la inhibición de esta red con el dasatinib TK podría ser una vulnerabilidad para atacar al TNBC.

En esta segunda parte de la tesis, utilizando un modelo *ex vivo* exclusivo de cáncer de mama construido con tejido adiposo asociado al carcinoma (CAAT) o células madre adiposas derivadas de CAAT de un paciente con TNBC (AdMSC<sup>TNBC</sup>) y líneas celulares inmortalizadas de TNBC (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153), mostramos cómo el nicho adiposo contribuye a la progresión del tumor y a la quimioresistencia en el TNBC.

Muchos otros grupos han abordado el estudio de la interacción entre el nicho adiposo y el TNBC. Para ello han empleado distintos tipos de modelos: líneas celulares inmortalizadas de MSC (Castells et al., 2013; D.-R. Chen et al., 2014), cultivos primarios de tejidos diferentes al tumoral (Hendijani, 2017; Mori et al., 2014; Priya et al., 2014), MSC derivadas de otras especies como ratón o cerdo (Baustian et al., 2015; Feyen et al., 2016) ensayos de co-cultivo de las poblaciones que se pretenden estudiar (D. Chen et al., 2015; Djomehri

et al., 2019). Sin embargo, estos modelos presentan algunos inconvenientes metodológicos. Por ejemplo, el cultivo prolongado de las líneas celulares inmortalizadas provoca que pierdan los rasgos del paciente del que se originaron, acumulando mutaciones cromosómicas y alejándose de su genotipo inicial. Los resultados obtenidos a partir del uso de modelos animales no son fácilmente extrapolables a humanos (J. Li et al., 2012) del mismo modo que los modelos de co-cultivo, donde la interpretación de los resultados obtenidos es compleja debido a que no se impide la comunicación bidireccional entre las dos poblaciones utilizadas, y no podemos establecer que factores son secretados por cada población celular y cuales en concreto son la causa o consecuencia de un efecto observado en un población celular determinada.

El tejido adiposo es una fuente importante de AdMSC. Diferentes estudios apuntan que estas células presentan un papel relevante en la proliferación, migración y metástasis de las células tumorales. Sin embargo, estos estudios se han realizado con AdMSC procedentes de regiones alejadas al tumor, como son el tejido adiposo subcutáneo o visceral. Otros estudios aíslan las MSC de otras procedencias siendo, la médula ósea, el cordón umbilical y las lipoaspiraciones de la grasa abdominal las más descritas (Hendijani, 2017; Melzer et al., 2018; Mori et al., 2014; Priya et al., 2014; Skolekova et al., 2016); limitando su relevancia clínica. Otros apuestan por los fibroblastos para el estudio del MT (Dirat et al., 2011; Matsumura et al., 2019). En nuestro modelo, mediante la técnica de cultivo de explantes, que tiene la ventaja sobre el método enzimático de prevenir la contaminación con células hematopoyéticas (Hendijani, 2017; Priya et al., 2014), aislamos las AdMSC a partir del tejido adiposo asociado al cáncer de pacientes con TNBC (CAAT) recién extraído y no de cualquier otra zona porque pensamos que es la forma ideal para reproducir de la forma más sencilla y eficazmente posible el nicho adiposo tumoral, ya que esto podría aportar resultados más interpretables y fiables.

Debido a las limitaciones que estos modelos presentan, nosotros hemos desarrollado un modelo de MT *ex vivo* capaz de mimetizar el MT del TNBC, centrándonos en el componente adiposo. La elección del tejido adiposo se debe no solo a que es el componente mayoritario de la mama, sino a que juega un papel activo en la comunicación entre el tumor y su microambiente mediante la secreción de factores de crecimiento, citoquinas y

hormonas (Lapeire et al., 2014), lo que aporta a este componente un carácter dinámico (protección y soporte de la mama). A diferencia de otros modelos utilizados para reproducir el nicho tumoral en cáncer de mama, donde generan MC de la grasa de pacientes para evaluar su efecto en células inmortalizadas de cáncer de mama hormonal positivo (Pistone Creydt et al., 2013), la importancia de nuestro modelo se fundamenta en la utilización de células aisladas de tejido adiposo peritumoral (CAAT) directamente de pacientes con TNBC mediante la técnica de cultivo de explantes, siendo esta aproximación hasta este momento, la primera vez que se usa para este tipo de ensayos y la que mejor imita hasta el momento las condiciones fisiológicas del nicho adiposo tumoral mamario de un paciente con TNBC .

Si bien es cierto que no es la única técnica para aislar AdMSC, para nosotros presenta más ventajas que el método de digestión enzimática. En la digestión enzimática, los fragmentos de tejido adiposo se tratan con enzimas proteolíticas para obtener una suspensión de células individuales. Después de los pasos de lavado, donde se pierden las citoquinas y factores de crecimiento endógenos, se cultiva la suspensión de células individuales en la placa de cultivo. Con la técnica de digestión enzimática, aislamos las células después de someterlas a varios tipos de estrés: la proteólisis, separación de todas sus comunicaciones fisiológicas con el tejido de forma repentina y la pérdida de citoquinas y factores de crecimiento endógenos. Todo ello hace que el riesgo de fracaso en el aislamiento sea demasiado alto. Además, con dicha técnica se aislarían poblaciones de células inespecíficas, ya que el tejido adiposo también puede contener células endoteliales, no solo AdMSC. En cambio, con la técnica de cultivo de explante se colocan trocitos de grasa directamente en la placa de cultivo sin ningún paso de digestión. Esta técnica se basa en la idea de que, debido a las heridas provocadas con el bisturí en el tejido cuando se extrajo de la zona peritumoral del paciente con TNBC, las células tienden a migrar hacia fuera del tejido, respondiendo a las señales que le manda su microambiente con el fin de cerrar la herida. En un cultivo de explante, como el tejido está en contacto con la placa de cultivo, las AdMSC migran a la placa. La continuación de la comunicación molecular entre las células migratorias y el tejido adiposo reduce el estrés del cultivo primario, además se continúan liberando citoquinas y factores del crecimiento que estimulan el crecimiento y

la proliferación celular del cultivo primario sin necesidad de agregar ningún factor de crecimiento exógeno (Hendijani, 2017).

La exposición al MC preparado a partir de AdMSC<sup>TNBC</sup> (AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM) promovió la tumorigenicidad y la capacidad de invasión de células TNBC. Estudios recientes vinculan la adquisición de estados similares a las CSC a un aumento de la ratio CD44/CD24 y la EMT con el aumento de la malignidad tumoral y la resistencia a los tratamientos (Shibue & Weinberg, 2017). Nuestros datos confirman además la idea de una comunicación activa entre las células tumorales y el tejido adiposo, en la que el componente adiposo deja de ser un órgano estático donde únicamente se almacena energía a uno dinámico, donde a través de la secreción de sus factores quimiotácticos es responsable del mantenimiento de un fenotipo agresivo de células tumorales de TNBC (Lapeire et al., 2014).

Los pacientes con TNBC albergan una gran cantidad de mutaciones somáticas, mutaciones frecuentes en el TP53 (83%) y reordenamientos aneuploides complejos (80%), que dan lugar a una amplia heterogeneidad intratumoral (Kim et al., 2018). Además, esta heterogeneidad va más allá, un tumor no está formado únicamente por células tumorales (células tumorales normales, y CSC) sino que además se encuentra influenciado e interaccionando al mismo tiempo con el MT que lo rodea. La resistencia a la quimioterapia es uno de los mayores problemas en la lucha contra el cáncer, más aún cuando hablamos del TNBC, que carece de terapias dirigidas y en el que la quimioterapia y la radioterapia son la única opción terapéutica disponible actualmente, hace que sea una prioridad estudiar concretamente en este subtipo tumoral el papel del MT en la aparición de resistencias.

Como hemos mencionado en la introducción, en el MT mamario existen una gran cantidad de señales paracrina bidireccionales, como la mediada por las citoquinas o factores de crecimiento que constituyen el diálogo entre las MSC y las células de cáncer de mama, capaces de estimular la diseminación tumoral (Majidinia & Yousefi, 2017). Los resultados obtenidos con los ensayos de formación de colonias y de estructuras 3D en Matrigel, demuestran que el secretoma de las AdMSC puede bloquear parcialmente el efecto inhibitorio de los agentes quimioterápicos empleados (cisplatino, doxorubicina y docetaxel), observándose un aumento de la capacidad metastática y el potencial de

recidiva, de las cuatro líneas de TNBC empleadas en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC, es decir, en presencia del AdMSC<sup>TNBC</sup>-MC las líneas celulares quedaban protegidas frente al efecto inhibitorio de los tratamientos pudiendo mantener sus propiedades tumorigénicas e invasivas y por tanto, producir una metástasis durante el tratamiento o una recidiva tras el. Este mismo comportamiento se observó cuando se evaluó el potencial de los agentes quimioterápicos mediante los ensayos de viabilidad, proliferación y de muerte celular por Annexin V en el citómetro de flujo. En cambio, no se observó el mismo efecto cuando las células fueron expuestas al HEK293T-MC. Del mismo modo, cuando se evaluó la respuesta a los agentes quimioterápicos en el modelo *in vivo*, corroborado anteriormente, que reproducía las características fisiopatológicas, se observó como los ratones coinyectados con las AdMSC y las células tumorales formaban tumores de mayor volumen e irrigación que los que no contenían el MT. Esto refuerza la idea de que los SAF de las CA-AdMSC de TNBC promueven un efecto inhibitorio a la quimioterapia dando lugar a una mayor quimioresistencia. Este efecto ya se observó en otros trabajos con CDDP en MDA-MB-231 (Skolekova et al., 2016) o para DOXO (D.-R. Chen et al., 2014), pero nunca se había testado con CA-AdMSC derivadas de TNBC. Entonces, la combinación de terapias dirigidas no sólo a la masa tumoral sino también a su MT circundante podría ser más efectiva que el actual tratamiento inespecífico del cáncer de mama.

Para determinar las vías de señalización implicadas en el efecto protector inducido por el AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM, evaluamos el perfil de activación de RTKs mediante un array. Estos estudios revelaron una alta activación de 6 proteínas en las células tumorales en respuesta al AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM (EGFR, Src, c-Abl, ERBB3, STAT1 y STAT3). Estudiamos en qué rutas de señalización intervenían estas proteínas y su relevancia en el cáncer de mama. Todas ellas están implicadas en vías de señalización cruciales en cáncer de mama: ErbB, Src, JAK/STAT, la vía PI3K/AKT y la vía MAPK.

Src es una proteína tirosina quinasa no receptora que desempeña un papel clave en muchas vías celulares, incluida la supervivencia, migración y proliferación celular. Se cree que los efectos del Src están mediados por la activación de las vías de señalización descendientes, incluyendo la MAPK, PI3K, STAT3 (Belli et al., 2020; Bjorge et al., 2011; Eroles et al., 2012). Además, Src modula la activación del receptor de TK EGFR y amplifica sus señales oncogénicas posteriores. (Belli et al., 2020). Del mismo modo, c-Abl es una

NRTK que se induce tras su activación por Src (Furstoss et al., 2002). STAT1 y STAT3 pertenecen a la familia STAT y están implicados en la activación y transducción de señales mediante su translocación al núcleo después de fosforilarse y activarse mediante JAK o Src (Qin et al., 2019). Por lo tanto, la activación de la vía de Src podría estar actuando como una pieza clave en la comunicación del MT con el tumor y estar regulando por tanto muchos aspectos de la oncogénesis como; la proliferación celular, la migración, la angiogénesis, la invasión y la metástasis.

Para explorar la implicación de esta vía en el efecto protector del MSC, empleamos el inhibidor de SFK dasatinib. Los resultados *in vitro* obtenidos tras la inhibición de SFK con dasatinib sugieren que el bloqueo de esta vía puede revertir el efecto protector proporcionado por el nicho adiposo del tumor produciendo una disminución del potencial de tumorigénesis e invasión, una disminución del potencial de recurrencia y un aumento de la muerte celular producida por la apoptosis en las células TNBC (MDA-MB-231) (Figura 56). *In vivo*, demostramos mediante un modelo preclínico (ratones inmunodeprimidos) cómo la coinyección de células tumorales con las AdMSC<sup>TNBC</sup> produjo una disminución del volumen del tumor en los ratones tratados con el inhibidor de SFK, el dasatinib.

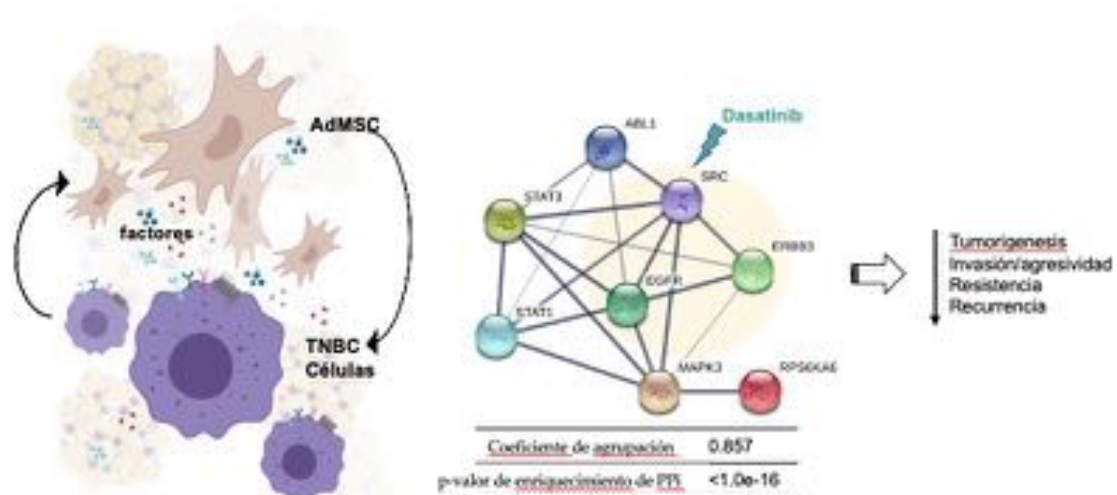


Figura 56. Resumen gráfico

Finalmente, nuestros resultados sugieren un papel relevante de la vía Src como mediadora en la interacción entre el nicho adiposo y la masa tumoral, y proporciona información fundamental para entender la progresión del cáncer de mama y en concreto el subtipo triple negativo, así como su comportamiento en respuesta a la quimioterapia. Nuestros resultados abren la puerta al desarrollo de nuevas estrategias dirigidas no sólo al tratamiento de tumores, sino también a las vías de señalización que regulan la MT para tratar a los pacientes con cáncer de mama de forma más eficaz.

Varios trabajos basados en datos preclínicos han propuesto dasatinib como un fármaco prometedor para ser utilizado solo o en combinación con fármacos contra el cáncer, principalmente para superar la resistencia, en TNBC (Tian et al., 2018). Dado el hecho de que las AdMSC<sup>TNBC</sup> crean un lecho protector para las células cancerosas, aumentando la expresión de los marcadores de *stemness* y conduciendo a una mayor tumorigenicidad y quimiorresistencia, la traslación de estos resultados al ámbito clínico debe considerar la importancia de esta población. Por lo tanto, aunque la combinación de dasatinib con quimioterapia en los pacientes no ha sido generalmente satisfactoria, nuestros resultados sugieren que podría merecer la pena seguir explorando esta opción de tratamiento. De hecho, hay dos estudios que informan de una respuesta completa en pacientes, siendo uno de ellos una paciente con CMTN que logró una respuesta completa con la combinación de dasatinib y terapia basada en taxanos en un ensayo clínico de fase II (Morris et al. 2018).

A la vista de los resultados con este inhibidor en los ensayos clínicos, dasatinib no tiene un papel en pacientes no seleccionados. Nuestros resultados sugieren que la medición de la infiltración tumoral de MSC en los pacientes sería una herramienta eficaz para identificar a los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con dasatinib, solo o en combinación con otros agentes.

8

D I S C U S I Ó N  
G E N E R A L

La vida es una unión simbiótica y cooperativa  
que permite triunfar a los que se asocian.

LYNN MARGULIS





## 8. Discusión General

Durante décadas, se ha pasado por alto la interacción de las células cancerosas con su microambiente y, por consiguiente, la mayoría de las terapias actuales están diseñadas para dirigirse únicamente a las células cancerosas y no para atacar una comunicación bidireccional entre ambas. Sin embargo, cada vez hay más pruebas sólidas de que la comunicación entre las células tumorales y su estroma circundante es crucial para impulsar la progresión del tumor mediante el aumento de las propiedades *stemness* de las células tumorales y el desarrollo de quimioresistencia terapéutica adquirida a los tratamientos en el cáncer de mama (Mehraj et al., 2021). Por esta razón, descifrar el diálogo entre ambos compartimentos es clave para diseñar estrategias de tratamiento exitosas.

En esta tesis hemos querido estudiar más en profundidad los mecanismos de resistencia del TNBC. En la primera parte identificamos una firma de 13 genes relacionados con *stemness* que podrían tener un papel clave no solo en la predicción de la respuesta del paciente a la quimioterapia y su pronóstico clínico, sino que también puede utilizarse como control en la prevención de la aparición de recidivas, comunes en TNBC, debido al gran porcentaje de CSC presentes en estos tumores (Bao & Prasad, 2019). Además, evaluamos como el iBET JQ1 es capaz de controlar su la transcripción de estos genes y, por tanto, alterar las propiedades de las CSC presentes en el tumor que, entre otros factores, son las causantes de la resistencia adquirida a los tratamientos. Al disminuir esta población o, al menos, bloquear sus características principales, podríamos, en cierta medida, reducir potencialmente la refractoriedad habitualmente producida frente a los tratamientos quimioterápicos en pacientes con TNBC. Nuestros datos evidencian que el inhibidor de BRD4 JQ1 podría ser aún más eficaz en combinación con otros fármacos contra el cáncer. Ejemplo de ello, serían su combinación exitosa con inhibidores de quinasas (Nieto-Jiménez et al., 2017; Stratikopoulos et al., 2015), inhibidores de la histona desacetilasa (Borbely et al., 2015) o su combinación con agentes quimioterapéuticos empleados a tratar este subtipo de cáncer, como cisplatino o docetaxel (Pérez-Peña et al., 2016). En esta línea, evaluar su combinación con otros fármacos antitumorales sería de gran interés en el futuro, sobre todo sobre modelos que tengan en cuenta las interacciones entre los componentes del MT.

El TA es el principal constituyente del microambiente del cáncer de mama (Kothari et al., 2020). Hasta hace poco, se había considerado como un mero depósito de energía, pero en el caso particular de la glándula mamaria, el TA es mucho más que eso. Muestra una gran plasticidad y, a través de señales secretadas, es capaz de controlar la población de células epiteliales circundantes (Hovey & Aimo, 2010). Aparte de nosotros, muchos otros grupos han intentado anteriormente arrojar luz sobre la interacción entre el nicho adiposo y el cáncer de mama, mostrando cómo este componente tiene un papel importante en la progresión del cáncer y el resultado de los pacientes (D'Esposito et al., 2020; Khandekar et al., 2011; Kothari et al., 2020; Nuncia-Cantarero et al., 2018); a pesar de ello, la mayoría de estos trabajos estaban dirigidos a evaluar la importancia de la obesidad, es decir, el exceso de TA, en el desarrollo del cáncer de mama, más que a investigar cómo este tejido se comunica con las células del tumor. Aun así, es su mayoría, estos trabajos se han centrado en los otros subtipos de cáncer de mama, principalmente los hormonales positivos, y sin embargo poco se sabe de la influencia del TA en el TNBC, subtipo en el que hemos centrado nuestro trabajo (D'Esposito et al., 2020; Khandekar et al., 2011; Kothari et al., 2020; Nuncia-Cantarero et al., 2018). Por otro lado, cabe destacar que los resultados de nuestro estudio, en contraste con los de otros en los que se emplea TA de pacientes sanos (Ejaz et al., 2020; Koellensperger et al., 2017; Niu & Wang, 2015; Ritter et al., 2015; Rowan et al., 2014), se beneficia además del uso de muestras frescas derivadas de pacientes de TNBC, aisladas a partir de TA peritumoral obtenido durante el proceso de extracción quirúrgica del tumor.

Actualmente, los modelos *in vitro* más empleados en investigación oncológica son cultivos adherentes 2D que carecen de la heterogeneidad intratumoral que se da *in vivo* y que no tienen en cuenta la comunicación de las células tumorales con los componentes estromales del MT, lo que provoca diferencias en las respuestas a los fármacos en entornos clínicos. La puesta en práctica de nuevos sistemas 3D más complejos y que recapitulen de manera más fiable el microambiente del tumor es de vital importancia para ayudar a descifrar la comunicación entre las células tumorales y el estroma y para predecir mejor la respuesta a fármacos, lo que allanará el camino para el desarrollo de terapias más eficientes para los pacientes con cáncer de mama (Mehraj et al., 2021). En estos modelos 3D, las respuestas

fisiológicas celulares serían más similares a su comportamiento *in vivo* (Edmondson et al., 2014).

En este trabajo, para determinar la importancia del componente adiposo del MT mamario en el mantenimiento de las características *stemness* de estos tumores, utilizamos un modelo exclusivo *ex vivo* de cáncer de mama construido con CAAT o AdMSC y líneas celulares TNBC inmortalizadas (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153), mostramos cómo el lecho adiposo peritumoral contribuye a la progresión tumoral y a la quimioresistencia en el TNBC y demostramos que las MSC median, al menos en parte, esta respuesta. Además, identificamos a Src como un mediador central de la respuesta y sugerimos que podría ser un buen candidato diana en el TNBC. Su inhibición con dasatinib podría ser una vulnerabilidad para atacar al TNBC.

Como el efecto de dasatinib podría no limitarse a la inhibición de Src o ABL, ya que también ha mostrado efecto sobre otras quinasas, como c-kit, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y STAT5 (Hoehn et al., 2016; Kennedy & Gadi, 2018), evaluamos su influencia en los principales nodos identificados. Así, demostramos cómo dasatinib es capaz de impactar en la activación no solo de la quinasa Src, sino también de otras de las quinasas identificadas como activadas en este contexto de EMT, como EGFR y ERBB3/HER3. Por el contrario, a pesar de ser una de las proteínas que interactúan con Src y uno de los principales nodos del PPI, no encontramos alteración alguna en el estado de STAT3. En esta línea, una inhibición dual de ambas moléculas, Src y STAT3, podría ser una estrategia para explorar en el futuro.

Dado que las células tumorales evolucionan continuamente y están en comunicación permanente con su MT, es difícil que las terapias basadas en un solo agente sean capaces de erradicar eficazmente tumores heterogéneos complejos. Para que esto pueda ser algún día una realidad, se necesitan ensayos clínicos prospectivos bien diseñados, que incluyan nuevas terapias combinadas o secuenciales, que incluyan tanto inhibidores de proteínas, como agentes quimioterápicos o inmunológicos, dirigidos tanto a las células tumorales de rápido crecimiento como a las CSC y al MT que las rodea para identificar las mejores opciones de tratamiento que superen la resistencia a los tratamientos en los pacientes de TNBC con un pronóstico desfavorable, con metástasis o recidivas. Sin lugar a duda, las

terapias basadas en combinación dirigida a las vías oncogénicas de las células tumorales y las interacciones entre el tumor y el estroma tendrá un efecto más completo y podrían erradicar eficazmente la enfermedad.

A este respecto, añadir más complejidad a nuestro modelo de MT *ex vivo*, como, por ejemplo, incluir cultivos 3D de las células tumorales, podría ser útil para evaluar nuevas terapias dirigidas y su posible respuesta en pacientes con TNBC que presenten tumores con un alto porcentaje de CSC y con alta infiltración de MSC. Debido a la capacidad de las CSC y de los factores secretados por las AdMSC<sup>TNBC</sup> de impulsar la adquisición de quimioresistencia, quisimos hacer una evaluación preliminar de este potencial modelo. Si el AdMSC-CM es capaz de aumentar los marcadores de *stemness*, ¿podría el JQ1 disminuirlos en un modelo enriquecido en CSC cultivado en presencia de AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM? Para contestar a esta pregunta llevamos a cabo un análisis preliminar para determinar por qRT-PCR los niveles de expresión de una batería de marcadores seleccionados a partir de los ya estudiados en esta tesis (Figura 57); *CD44* y *CD24* relacionados con la tumorigenesis, *ALDH1* relacionado con la migración y la metástasis tumoral, *VIM* implicado en la TEM hacia un estado más indiferenciado. Y los marcadores *ABCG2*, y *RUNX2*, implicados en fenómenos de resistencia a los tratamientos quimioterápicos actuales, así como en la iniciación y el mantenimiento de la *stemness* (Mao & Unadkat, 2015; Serrano-Oviedo et al., 2020; Tandon et al., 2018). Una vez analizados los niveles de expresión relativa de ARNm de estas células para los marcadores *CD44*, *CD24*, *ALDH1*, *VIM*, *ABCG2* y *RUNX2*, observamos como tras la exposición al AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM aumentan los marcadores de *stemness* tumoral. A su vez, estos niveles de expresión disminuyen en aquellas células que recibieron un pretratamiento con el AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM seguido de un tratamiento con el iBET JQ1, llegando incluso a equiparar sus niveles con los del medio control.

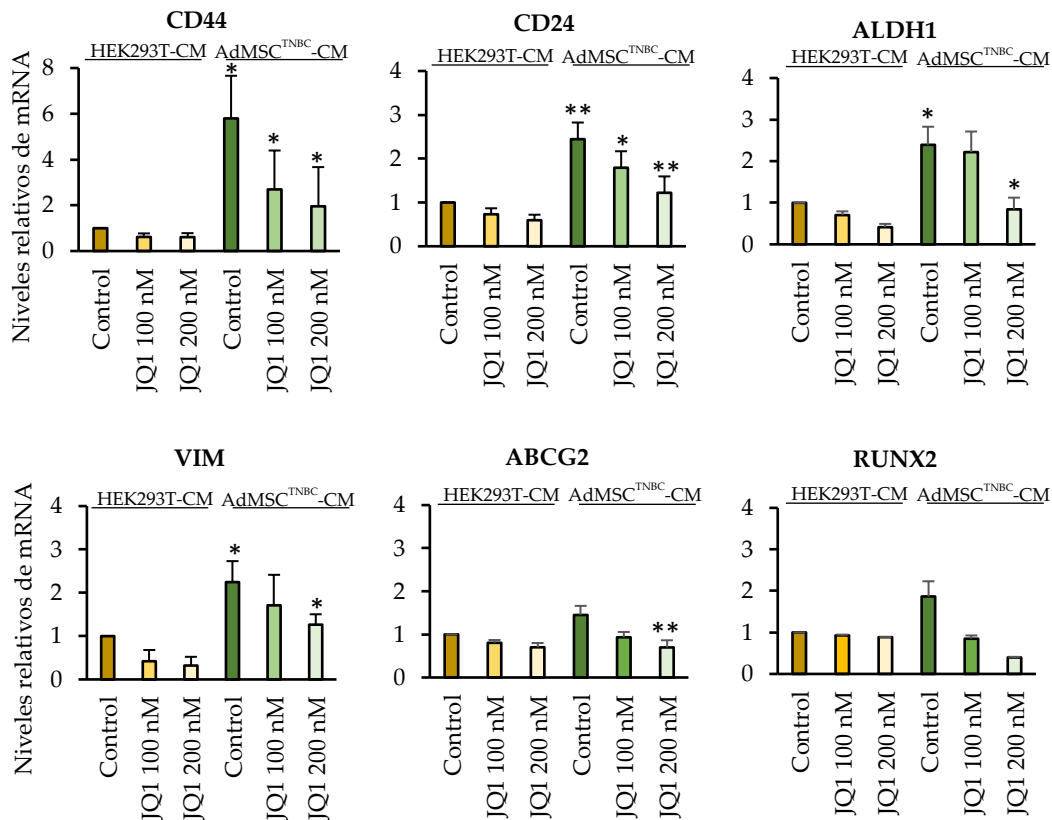
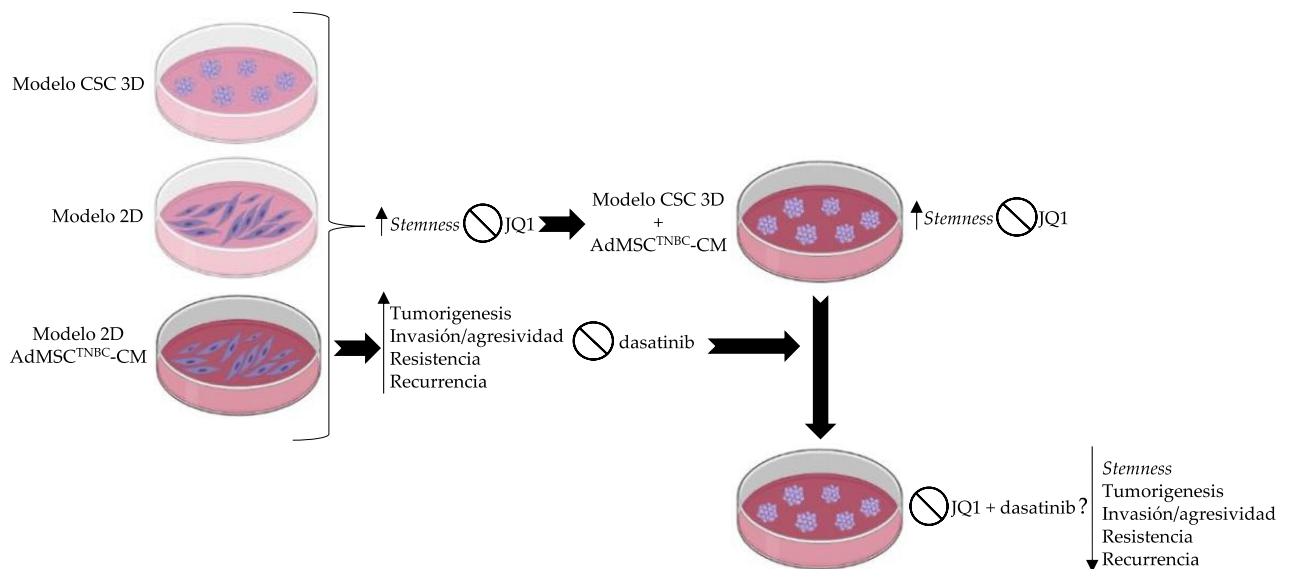


Figura 57. Niveles de expresión relativa de ARNm para los marcadores CD44, CD24, ALDH1, VIM, ABCG2 y RUNX2 tras el tratamiento con JQ1 (100 y 200nM) en presencia de HEK293T-CM o AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM.

Por tanto, al igual que demostramos en la primera parte de los resultados de esta tesis, el tratamiento con JQ1 (100 y 200 nM) es capaz de reducir los niveles de los marcadores relacionados con las tumorigénesis (CD44, CD24), la migración y metástasis tumoral (ALDH1), desplazando la EMT hacia un estado más epitelial (VIM) en este nuevo modelo de MT. A su vez, tras el tratamiento con JQ1 en presencia de AdMSC<sup>TNBC</sup>-CM se reducen los niveles de expresión de los marcadores de resistencia a la quimioterapia (ABCG2 y RUNX2), demostrando que los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis pueden ser trasladados a un contexto más fisiológico. Debido a que los niveles de expresión de RUNX2 y ABCG2 se asocian con una peor respuesta a la quimioterapia, tumores que sean tratados con JQ1 podrían ser menos resistentes a los agentes

quimioterápicos y, por tanto, responder mejor al tratamiento de quimioterapia estándar para pacientes con TNBC.

En línea con estos resultados preliminares, como perspectivas de trabajo a raíz de esta tesis, sería interesante evaluar la combinación del inhibidor de Src dasatinib y el iBET JQ1 (Figura 58). La combinación de ambos fármacos podría ser útil para superar la resistencia a la quimioterapia al mismo tiempo que reducimos las propiedades *stemness* del tumor y del MT que lo rodea, para así conseguir interrumpir la comunicación bidireccional existente entre ambos compartimentos, parénquima y estroma. Todo ello en nuestro modelo 3D de microambiente tumoral.



**Figura 58. Perspectivas futuras.**

9

C O N C L U S I O N E S

La ciencia y la vida cotidiana no pueden ni  
deben estar separadas.

ROSALIND FRANKLIN





## 9. Conclusiones

1. El iBET JQ1 es capaz de alterar la transcripción de la firma de genes identificada relacionados con la *stemness* tumoral y, por tanto, alterar las propiedades de las CSC presentes en el tumor.
2. El panel de genes identificados relacionados con la *stemness* podría tener un papel clave no solo en la predicción de la respuesta del paciente a la quimioterapia y su pronóstico clínico, sino también en la prevención de la aparición de recidivas, comunes en TNBC, debido al gran porcentaje de CSC presentes en el tumor.
3. El tejido adiposo asociado a tumor modifica las células de TNBC monocapa y promueve un estado indiferenciado
4. El secretoma de las AdMSC induce la sobreexpresión de marcadores de malignidad, favoreciendo la tumorigénesis y la capacidad de invasión de las células del TNBC
5. Las SAF de AdMSC tienen un papel clave en el MT mamario del TNBC y proporcionan un nicho protector contra la quimioterapia *in vitro* e *in vivo*, promoviendo la viabilidad celular, la recurrencia del tumor, la capacidad metastásica y disminuyendo la muerte celular tras la exposición a un tratamiento quimioterápico.
6. Las SAF activan en las células de TNBC la vía de señalización Src.
7. El bloqueo específico de la vía de señalización SFK revierte el efecto protector proporcionado por el nicho adiposo tumoral *in vitro* e *in vivo*, reduciendo la capacidad tumorigénica de los tumores, e induciendo la muerte celular en el TNBC.
8. El iSrc dasatinib podría ser una diana terapéutica específica de TNBC, y por tanto un nuevo tratamiento dirigido no solo a atacar las células tumorales de TNBC sino a interrumpir la comunicación del MT con el tumor.
9. El tratamiento del TNBC con JQ1 en nuestro de MT *ex vivo* reduce la expresión de los marcadores relacionados con la tumorigénesis, migración, metástasis tumoral y resistencia a la quimioterapia desplazando la EMT hacia un estado más epitelial.

10. La combinación del inhibidor de Src dasatinib y el iBET JQ1 podría ser clave para interrumpir la comunicación bidireccional existente entre el tumor y el MT que lo rodea y superar la resistencia a la quimioterapia característica del TNBC.

# 10

B I B L I O G R A F Í A

Antes que cualquier otra cosa, la preparación es  
la llave del éxito.

ALEXANDER GRAHAM BELL



# 10. Bibliografía

Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J., & Pietenpol, J. A. (2015). Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer*, 121(1), 8-16. <https://doi.org/10.1002/cncr.28914>

Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, 32(25), 2794-2803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870>

Ahn, S. Y. (2020). The Role of MSCs in the Tumor Microenvironment and Tumor Progression. *Anticancer Research*, 40(6), 3039-3047. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14284>

Alqahtani, A., Choucair, K., Ashraf, M., Hammouda, D. M., Alloghbi, A., Khan, T., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2019). Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: A review of preclinical and clinical advances in cancer therapy. *Future Science OA*, 5(3). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0115>

Alzahrani, A. S. (2019). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.009>

Andreopoulou, E., Schweber, S. J., Sparano, J. A., & McDaid, H. M. (2015). Therapies for triple negative breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16(7), 983-998. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1032246>

Arrechea Irigoyen, M. A., Vicente García, F., Córdoba Iturriagoitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011). Molecular subtypes of breast cancer: Prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(2), 219-233. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272011000200008>

Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C., & Coffman, L. (2020). Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1234, 31-42. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_3)

Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(2), 157-167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>

Bagnato, G., Leopizzi, M., Urciuoli, E., & Peruzzi, B. (2020). Nuclear Functions of the Tyrosine Kinase Src. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082675>

Bahman, F., Pittalà, V., Haider, M., & Greish, K. (2021). Enhanced Anticancer Activity of Nanoformulation of Dasatinib against Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(6), 559. <https://doi.org/10.3390/jpm11060559>

Balázs, G. (s. f.). *KM-plot*. Kaplan-Meier plotter. Recuperado 8 de octubre de 2020, de <http://www.kmplot.com/analysis>

Banerjee, K., & Resat, H. (2016). Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International Journal of Cancer*, 138(11), 2570-2578. <https://doi.org/10.1002/ijc.29923>

Bao, B., & Prasad, A. S. (2019). Targeting CSC in a Most Aggressive Subtype of Breast Cancer TNBC. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1152, 311-334. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_17)

Baustian, C., Hanley, S., & Ceredig, R. (2015). Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0139-5>

- Belli, S., Esposito, D., Servetto, A., Pesapane, A., Formisano, L., & Bianco, R. (2020). c-Src and EGFR Inhibition in Molecular Cancer Therapy: What Else Can We Improve? *Cancers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061489>
- Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: Recent treatment advances. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Bertolini, F., Lohsiriwat, V., Petit, J.-Y., & Kolonin, M. G. (2012). Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: A challenge for scientists, oncologists and surgeons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.04.004>
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(11), 674-690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Bisgrove, D. A., Mahmoudi, T., Henklein, P., & Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13690-13695. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705053104>
- Bjorge, J. D., Pang, A. S., Funnell, M., Chen, K. Y., Diaz, R., Magliocco, A. M., & Fujita, D. J. (2011). Simultaneous siRNA Targeting of Src and Downstream Signaling Molecules Inhibit Tumor Formation and Metastasis of a Human Model Breast Cancer Cell Line. *PLOS ONE*, 6(4), e19309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019309>
- Bochet, L., Meulle, A., Imbert, S., Salles, B., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(1), 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.101>
- Borbely, G., Haldosen, L.-A., Dahlman-Wright, K., & Zhao, C. (2015). Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(32), 33623-33635.
- Bristol-Myers Squibb. (2016). *A Phase IV, Open-label, Multicenter Study of Dasatinib in*



*Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia (CP-CML) Patients With Chronic, Low-grade Non-Hematologic Toxicity to Imatinib* (Clinical trial registration results/NCT01660906). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01660906](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01660906)

Brooks, D. L. P., Schwab, L. P., Krutilina, R., Parke, D. N., Sethuraman, A., Hoogewijs, D., Schörg, A., Gotwald, L., Fan, M., Wenger, R. H., & Seagroves, T. N. (2016). ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Molecular Cancer*, 15, 26. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0510-x>

Burugu, S., Asleh-Aburaya, K., & Nielsen, T. O. (2017). Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: Detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 24(1), 3-15. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0698-z>

Busby, M., Hallett, M. T., & Plante, I. (2018). The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030693>

Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V. P., Yadav, A. S., Kumar, D., & Kundu, G. C. (2018). Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: Signaling, therapeutic implications and challenges. *Molecular Cancer*, 17(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0797-x>

Campbell, L. L., & Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(19), 2332-2338. <https://doi.org/10.4161/cc.6.19.4914>

*Cancer today*. (s. f.). Recuperado 28 de octubre de 2020, de <http://gco.iarc.fr/today/home>

Cardenas, C., Kwon, J.-Y., & Maeng, Y.-S. (2016, diciembre 18). *Human Cord Blood-Derived CD133+/C-Kit+/Lin- Cells Have Bipotential Ability to Differentiate into Mesenchymal Stem Cells and Outgrowth Endothelial Cells* [Research Article]. *Stem Cells International*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/7162160>

Castells, M., Milhas, D., Gandy, C., Thibault, B., Rafii, A., Delord, J.-P., & Couderc, B. (2013). Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from

apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death & Disease*, 4(10), e887-e887. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.384>

Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P., & Couderc, B. (2012). Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9545-9571. <https://doi.org/10.3390/ijms13089545>

Chandhoke, A. S., Chanda, A., Karve, K., Deng, L., & Bonni, S. (2017). The PIAS3-Smurf2 sumoylation pathway suppresses breast cancer organoid invasiveness. *Oncotarget*, 8(13), 21001-21014. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15471>

Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736-750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>

Chen, D., Liu, S., Ma, H., Liang, X., Ma, H., Yan, X., Yang, B., Wei, J., & Liu, X. (2015). Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. *Cancer Cell International*, 15(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0198-9>

Chen, D.-R., Lu, D.-Y., Lin, H.-Y., & Yeh, W.-L. (2014, julio 16). *Mesenchymal Stem Cell-Induced Doxorubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer* [Research Article]. BioMed Research International; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2014/532161>

Cheng, S., Huang, Y., Lou, C., He, Y., Zhang, Y., & Zhang, Q. (2019). FSTL1 enhances chemoresistance and maintains stemness in breast cancer cells via integrin  $\beta 3$ /Wnt signaling under miR-137 regulation. *Cancer Biology & Therapy*, 20(3), 328-337. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1529101>

Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., & Wei, X. (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 1-39. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>

- Coughlin, S. S. (2019). Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1152, 9-29. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_2)
- Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K. Y., Hicks, J., King, T. A., & Reis-Filho, J. S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology*, 7(5), 859-869. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.07.005>
- Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 5(4), 275-284. <https://doi.org/10.1038/nrc1590>
- Deepak, K. G. K., Vempati, R., Nagaraju, G. P., Dasari, V. R., S., N., Rao, D. N., & Malla, R. R. (2020). Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacological Research*, 153, 104683. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104683>
- Denis, G. V., Vaziri, C., Guo, N., & Faller, D. V. (2000). RING3 Kinase Transactivates Promoters of Cell Cycle Regulatory Genes through E2F. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 417-424.
- D'Esposito, V., Ambrosio, M. R., Giuliano, M., Cabaro, S., Miele, C., Beguinot, F., & Formisano, P. (2020). Mammary Adipose Tissue Control of Breast Cancer Progression: Impact of Obesity and Diabetes. *Frontiers in Oncology*, 10, 1554. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01554>
- Diaz Bessone, M. I., Gattas, M. J., Laporte, T., Tanaka, M., & Simian, M. (2019). The Tumor Microenvironment as a Regulator of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00547>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., Gonidec, S. L., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455-2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN->

Djomehri, S. I., Burman, B., Gonzalez, M. E., Takayama, S., & Kleer, C. G. (2019). A reproducible scaffold-free 3D organoid model to study neoplastic progression in breast cancer. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 13(1), 129-143. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0498-7>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

D'souza, N., Burns, J. S., Grisendi, G., Candini, O., Veronesi, E., Piccinno, S., Horwitz, E. M., Paolucci, P., Conte, P., & Dominici, M. (2013a). MSC and Tumors: Homing, Differentiation, and Secretion Influence Therapeutic Potential. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 130, 209-266. [https://doi.org/10.1007/10\\_2012\\_150](https://doi.org/10.1007/10_2012_150)

D'souza, N., Burns, J. S., Grisendi, G., Candini, O., Veronesi, E., Piccinno, S., Horwitz, E. M., Paolucci, P., Conte, P., & Dominici, M. (2013b). MSC and Tumors: Homing, Differentiation, and Secretion Influence Therapeutic Potential. En B. Weyand, M. Dominici, R. Hass, R. Jacobs, & C. Kasper (Eds.), *Mesenchymal Stem Cells—Basics and Clinical Application II* (pp. 209-266). Springer. [https://doi.org/10.1007/10\\_2012\\_150](https://doi.org/10.1007/10_2012_150)

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207-218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>

Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P. J., & Parissenti, A. M. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism*, 16(6), 412-426. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>

Ejaz, A., Yang, K. S., Venkatesh, K. P., Chinnapaka, S., Kokai, L. E., & Rubin, J. P. (2020). The Impact of Human Lipoaspirate and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Contact Culture on Breast Cancer Cells: Implications in Breast Reconstruction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9171. <https://doi.org/10.3390/ijms21239171>

Elective surgery cancellations due to the COVID-19 pandemic: Global predictive modelling to inform surgical recovery plans. (2020). *The British Journal of Surgery*, 107(11), 1440-1449. <https://doi.org/10.1002/bjs.11746>

Ellis, H., & Ma, C. X. (2019). PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Current Oncology Reports*, 21(12), 110. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0846-7>

Elsberger, B., Fullerton, R., Zino, S., Jordan, F., Mitchell, T. J., Brunton, V. G., Mallon, E. A., Shiels, P. G., & Edwards, J. (2010). Breast cancer patients' clinical outcome measures are associated with Src kinase family member expression. *British Journal of Cancer*, 103(6), 899-909. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605829>

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

Feyen, D. A. M., van den Akker, F., Noort, W., Chamuleau, S. A. J., Doevendans, P. A., & Sluijter, J. P. G. (2016). Isolation of Pig Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. In M. Gnechi (Ed.), *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols* (pp. 225-232). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_12)

Figuroa-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. M., & Wolff, A. C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast*, 23(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011>

Filippakopoulos, P., & Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: Epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(5), 337-356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., ... Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327), 1067-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09504>

Finn, R. S. (2008). Targeting Src in breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(8), 1379-1386. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn291>

Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15-18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>

Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., & Gewirtz, D. A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 649-656.

Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938-1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>

Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America*, 27(1), 95-120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(2), 140-156. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>

Furstoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barilà, D., Superti-Furga, G., & Roche, S. (2002). C-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *The EMBO Journal*, 21(4), 514-524. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.514>

Furtek, S. L., Backos, D. S., Matheson, C. J., & Reigan, P. (2016). Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chemical Biology*, 11(2), 308-318. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00945>

Galan-Moya, E. M., Le Guelte, A., Lima Fernandes, E., Thirant, C., Dwyer, J., Bidere, N., Couraud, P.-O., Scott, M. G. H., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., & Gavard, J. (2011). Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Reports*, 12(5), 470-476. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.39>

Galan-Moya, E. M., Treps, L., Oliver, L., Chneiweiss, H., Vallette, F. M., Bidère, N., & Gavard, J. (2014). Endothelial secreted factors suppress mitogen deprivation-induced autophagy and apoptosis in glioblastoma stem-like cells. *PloS One*, 9(3), e93505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093505>

Garutti, M., Pelizzari, G., Bartoletti, M., Malfatti, M. C., Gerratana, L., Tell, G., & Puglisi, F. (2019). Platinum Salts in Patients with Breast Cancer: A Focus on Predictive Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143390>

Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., & 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), 555-567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>

Giordano, S. H., Buzdar, A. U., & Hortobagyi, G. N. (2002). Breast cancer in men. *Annals of Internal Medicine*, 137(8), 678-687. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00013>

Glenn, J. D., & Whartenby, K. A. (2014). Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), 526-539. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526>

Gonzales-Cope, M., Sidoli, S., Bhanu, N. V., Won, K.-J., & Garcia, B. A. (2016). Histone H4 acetylation and the epigenetic reader Brd4 are critical regulators of pluripotency in embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 17, 95. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2414-y>

Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 48-58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>

Guelte, A. L., Galan-Moya, E.-M., Dwyer, J., Treps, L., Kettler, G., Hebda, J. K., Dubois, S., Auffray, C., Chneiweiss, H., Bidere, N., & Gavard, J. (2012). Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *Journal of Cell Science*, 125(17), 4137-4146. <https://doi.org/10.1242/jcs.108282>

Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., & Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(3), 725-731. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0674-9>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>



Hanna, T. P., King, W. D., Thibodeau, S., Jalink, M., Paulin, G. A., Harvey-Jones, E., O'Sullivan, D. E., Booth, C. M., Sullivan, R., & Aggarwal, A. (2020). Mortality due to cancer treatment delay: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *371*, m4087. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4087>

He, M. Y., Rancoule, C., Rehalia-Blanchard, A., Espenel, S., Trone, J.-C., Bernichon, E., Guillaume, E., Vallard, A., & Magné, N. (2018). Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *131*, 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.09.004>

He, W., Liang, B., Wang, C., Li, S., Zhao, Y., Huang, Q., Liu, Z., Yao, Z., Wu, Q., Liao, W., Zhang, S., Liu, Y., Xiang, Y., Liu, J., & Shi, M. (2019). MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer. *Oncogene*, *38*(23), 4637-4654. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0747-0>

Hendijani, F. (2017). Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Proliferation*, *50*(2), e12334. <https://doi.org/10.1111/cpr.12334>

Hiraga, T., Ito, S., & Nakamura, H. (2016). EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *International Journal of Cancer*, *138*(7), 1698-1708. <https://doi.org/10.1002/ijc.29921>

Hiscox, S., & Nicholson, R. I. (2008). Src inhibitors in breast cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *12*(6), 757-767. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.6.757>

Hoehn, D., Cortes, J. E., Medeiros, L. J., Jabbour, E. J., Hidalgo, J. E., Kanagal-Shamanna, R., & Bueso-Ramos, C. E. (2016). Multiparameter Analysis of Off-Target Effects of Dasatinib on Bone Homeostasis in Patients With Newly Diagnosed Chronic Myelogenous Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, *16* Suppl, S86-92. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.02.027>

Hortobágyi, G. N. (1997). Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs*, *54*(4), 1-7. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700544-00003>

Hovey, R. C., & Aimo, L. (2010). Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(3), 279-290. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9187-8>

Hu, T., Zhou, R., Zhao, Y., & Wu, G. (2016). Integrin  $\alpha 6$ /Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy. *Scientific Reports*, 6, 33376. <https://doi.org/10.1038/srep33376>

Huang, F., Reeves, K., Han, X., Fairchild, C., Platero, S., Wong, T. W., Lee, F., Shaw, P., & Clark, E. (2007). Identification of Candidate Molecular Markers Predicting Sensitivity in Solid Tumors to Dasatinib: Rationale for Patient Selection. *Cancer Research*, 67(5), 2226-2238. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3633>

Iyengar, P., Combs, T. P., Shah, S. J., Gouon-Evans, V., Pollard, J. W., Albanese, C., Flanagan, L., Tenniswood, M. P., Guha, C., Lisanti, M. P., Pestell, R. G., & Scherer, P. E. (2003). Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*, 22(41), 6408-6423. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206737>

Iyengar, P., Espina, V., Williams, T. W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L. A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., Chopra, N., Russell, R. G., Sasisekharan, R., Trock, B. J., Lippman, M., Calvert, V. S., Petricoin, E. F., Liotta, L., Dadachova, E., ... Scherer, P. E. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1163-1176. <https://doi.org/10.1172/JCI23424>

J, P., S, K., J, J., Sc, R., Dm, M., J, Y., Z, K., Jh, C., Mm, K., Sk, B., S, H., L, K., R, M., Kd, B., & W, T. (2016, diciembre 7). *MLLT11/AF1q boosts oncogenic STAT3 activity through Src-PDGFR tyrosine kinase signaling*. *Oncotarget*; *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9759>

Jain, A. K., & Barton, M. C. (2017). Bromodomain Histone Readers and Cancer. *Journal of Molecular Biology*, 429(13), 2003-2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.020>

- Jhan, J.-R., & Andrechek, E. R. (2017). Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*, 18(17), 1595-1609. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0117>
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q., & Wang, Y. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0801-5>
- Joerger, M. (2016). Treatment regimens of classical and newer taxanes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(2), 221-233. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2893-6>
- Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., & Lippard, S. J. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical reviews*, 116(5), 3436-3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>
- Kadota, M., Sato, M., Duncan, B., Ooshima, A., Yang, H. H., Diaz-Meyer, N., Gere, S., Kageyama, S.-I., Fukuoka, J., Nagata, T., Tsukada, K., Dunn, B. K., Wakefield, L., & Lee, M. P. (2009). Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA. *Cancer research*, 69(18), 7357-7365. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0064>
- Kanwal, R., Gupta, K., & Gupta, S. (2015). Cancer Epigenetics: An Introduction. En M. Verma (Ed.), *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis* (pp. 3-25). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1)
- Keenan, T. E., & Tolaney, S. M. (2020). Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(4), 479-489. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.7554>
- Kennedy, L. C., & Gadi, V. (2018). Dasatinib in breast cancer: Src-ing for response in all the wrong kinases. *Annals of Translational Medicine*, 6(Suppl 1), S60. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.26>

Khandekar, M. J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews. Cancer*, 11(12), 886-895. <https://doi.org/10.1038/nrc3174>

Khera, L., Vinik, Y., Maina, F., & Lev, S. (2021). The AXL-PYK2-PKC $\alpha$  axis as a nexus of stemness circuits in TNBC. *Life Science Alliance*, 4(6). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000985>

Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., & Navin, N. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single Cell Sequencing. *Cell*, 173(4), 879-893.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.041>

Kim, H. I., Hong, S. H., Ku, J. M., Kim, M. J., Ju, S. W., Chang, S. W., Cheon, C., & Ko, S.-G. (2020). Gardenia jasminoides Enhances CDDP-Induced Apoptosis of Glioblastoma Cells via AKT/mTOR Pathway While Protecting Death of Astrocytes. *Nutrients*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.3390/nu12010196>

Koellensperger, E., Bonnert, L.-C., Zoernig, I., Marmé, F., Sandmann, S., Germann, G., Gramley, F., & Leimer, U. (2017). The impact of human adipose tissue-derived stem cells on breast cancer cells: Implications for cell-assisted lipotransfers in breast reconstruction. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0579-1>

Kothari, C., Diorio, C., & Durocher, F. (2020). The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5760. <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>

Krens, S. D., McLeod, H. L., & Hertz, D. L. (2013). Pharmacogenetics, enzyme probes and therapeutic drug monitoring as potential tools for individualizing taxane therapy. *Pharmacogenomics*, 14(5), 555-574. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.33>

Kumari, A., Folk, W. P., & Sakamuro, D. (2017). The Dual Roles of MYC in Genomic Instability and Cancer Chemoresistance. *Genes*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/genes8060158>

Kurebayashi, J., Kanomata, N., Moriya, T., Kozuka, Y., Watanabe, M., & Sonoo, H. (2010). Preferential antitumor effect of the Src inhibitor dasatinib associated with a decreased proportion of aldehyde dehydrogenase 1-positive cells in breast cancer cells of the basal B subtype. *BMC Cancer*, *10*, 568. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-568>

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *128*(11), 2527-2535. <https://doi.org/10.1002/ijc.26031>

Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schouppe, E., Mommer, C., Nikolaou, A., Morias, Y., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Distinct subsets, distinct functions. *The International Journal of Developmental Biology*, *55*(7-9), 861-867. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113371dl>

Lapeire, L., Hendrix, A., Lambein, K., Bockstal, M. V., Braems, G., Broecke, R. V. D., Limame, R., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Vanhove, C., Maynard, D., Lehuédé, C., Muller, C., Valet, P., Gespach, C. P., Bracke, M., Cocquyt, V., Denys, H., & Wever, O. D. (2014). Cancer-Associated Adipose Tissue Promotes Breast Cancer Progression by Paracrine Oncostatin M and Jak/STAT3 Signaling. *Cancer Research*, *74*(23), 6806-6819. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0160>

Lau, M. C.-C., Ng, K. Y., Wong, T. L., Tong, M., Lee, T. K., Ming, X.-Y., Law, S., Lee, N. P., Cheung, A. L., Qin, Y.-R., Chan, K. W., Ning, W., Guan, X.-Y., & Ma, S. (2017). FSTL1 Promotes Metastasis and Chemoresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through NFκB-BMP Signaling Cross-talk. *Cancer Research*, *77*(21), 5886-5899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1411>

Lebert, J. M., Lester, R., Powell, E., Seal, M., & McCarthy, J. (2018). Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Current Oncology*, 25(Suppl 1), S142-S150. <https://doi.org/10.3747/co.25.3954>

Lehmann, B. D., Pietersen, J. A., & Tan, A. R. (2015). Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 35, e31-e39. [https://doi.org/10.14694/EdBook\\_AM.2015.35.e31](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e31)

Li, J., Ezzelarab, M. B., & Cooper, D. K. C. (2012). Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 19(5), 273-285. <https://doi.org/10.1111/xen.12000>

Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., & Yang, Y. (2017). Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Scientific Reports*, 7(1), 13856. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>

Lin, C.-Y., Barry-Holson, K. Q., & Allison, K. H. (2016). Breast cancer stem cells: Are we ready to go from bench to bedside? *Histopathology*, 68(1), 119-137. <https://doi.org/10.1111/his.12868>

Lindauer, M., & Hochhaus, A. (2018). Dasatinib. En U. M. Martens (Ed.), *Small Molecules in Hematology* (pp. 29-68). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_2)

Liu, W., Stein, P., Cheng, X., Yang, W., Shao, N.-Y., Morrisey, E. E., Schultz, R. M., & You, J. (2014). BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death and Differentiation*, 21(12), 1950-1960. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.124>

Lu, L., Chen, Z., Lin, X., Tian, L., Su, Q., An, P., Li, W., Wu, Y., Du, J., Shan, H., Chiang, C.-M., & Wang, H. (2020). Inhibition of BRD4 suppresses the malignancy of breast cancer cells via regulation of Snail. *Cell Death & Differentiation*, 27(1), 255-268. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0353-2>

- Ma, J.-H., Qin, L., & Li, X. (2020). Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0527-z>
- Majidinia, M., & Yousefi, B. (2017). Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. *Chemical Biology & Drug Design*, 89(3), 309-318. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12893>
- Malta, T. M., Sokolov, A., Gentles, A. J., Burzykowski, T., Poisson, L., Weinstein, J. N., Kamińska, B., Huelsken, J., Omberg, L., Gevaert, O., Colaprico, A., Czerwińska, P., Mazurek, S., Mishra, L., Heyn, H., Krasnitz, A., Godwin, A. K., Lazar, A. J., Stuart, J. M., ... Wiznerowicz, M. (2018). Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation. *Cell*, 173(2), 338-354.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.034>
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 514-520. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02179-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02179-5)
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—An update. *The AAPS Journal*, 17(1), 65-82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. *Cancer metastasis reviews*, 32(0), 303-315. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3>
- Martelotto, L. G., Ng, C. K. Y., Piscuoglio, S., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2014). Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(3), 210. <https://doi.org/10.1186/bcr3658>
- Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1805(1), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>

Matsumura, Y., Ito, Y., Mezawa, Y., Sulidan, K., Daigo, Y., Hiraga, T., Mogushi, K., Wali, N., Suzuki, H., Itoh, T., Miyagi, Y., Yokose, T., Shimizu, S., Takano, A., Terao, Y., Saeki, H., Ozawa, M., Abe, M., Takeda, S., ... Orimo, A. (2019). Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial–mesenchymal plasticity. *Life Science Alliance*, 2(4). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900425>

Mehraj, U., Ganai, R. A., Macha, M. A., Hamid, A., Zargar, M. A., Bhat, A. A., Nasser, M. W., Haris, M., Batra, S. K., Alshehri, B., Al-Baradie, R. S., Mir, M. A., & Wani, N. A. (2021). The tumor microenvironment as driver of stemness and therapeutic resistance in breast cancer: New challenges and therapeutic opportunities. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00634-9>

Melzer, C., von der Ohe, J., & Hass, R. (2018). Enhanced metastatic capacity of breast cancer cells after interaction and hybrid formation with mesenchymal stroma/stem cells (MSC). *Cell Communication and Signaling : CCS*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0215-4>

Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer : Targets and Therapy*, 11, 151-164. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>

Montero, J. C., Seoane, S., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2011). Inhibition of Src Family Kinases and Receptor Tyrosine Kinases by Dasatinib: Possible Combinations in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 17(17), 5546-5552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2616>

Moore, N., & Lyle, S. (2010, septiembre 29). *Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance* [Review Article]. *Journal of Oncology*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2011/396076>

Mori, Y., Ohshimo, J., Shimazu, T., He, H., Takahashi, A., Yamamoto, Y., Tsunoda, H., Tojo, A., & Nagamura-Inoue, T. (2014). Improved Explant Method to Isolate Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Immunosuppressive Properties. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(4), 367-372. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0385>



Moshirfar, M., Villarreal, A., & Ronquillo, Y. (2020). Tyrosine Kinase Inhibitor Keratitis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562293/>

Mostert, B., Kraan, J., Sieuwerts, A. M., van der Spoel, P., Bolt-de Vries, J., Prager-van der Smissen, W. J. C., Smid, M., Timmermans, A. M., Martens, J. W. M., Gratama, J. W., Foekens, J. A., & Sleijfer, S. (2012). CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Letters*, 319(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.031>

Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Research*, 69(14), 5627-5629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0654>

Muschler, J., & Streuli, C. H. (2010). Cell–Matrix Interactions in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), a003202. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003202>

Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8381-8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>

Najafi, M., Mortezaee, K., & Majidpoor, J. (2019). Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sciences*, 234, 116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>

Nam, S., Kim, D., Cheng, J. Q., Zhang, S., Lee, J.-H., Buettner, R., Mirosevich, J., Lee, F. Y., & Jove, R. (2005). Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 65(20), 9185-9189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1731>

Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/cells8090957>

Nieto-Jimenez, C., Alcaraz-Sanabria, A., Martinez-Canales, S., Corrales-Sanchez, V., Montero, J. C., Burgos, M., Nuncia-Cantarero, M., Pandiella, A., Galan-Moya, E. M., & Ocaña, A. (2020). Checkpoint Kinase 1 Pharmacological Inhibition Synergizes with DNA-Damaging Agents and Overcomes Platinum Resistance in Basal-Like Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239034>

Nieto-Jiménez, C., Alcaraz-Sanabria, A., Pérez-Peña, J., Corrales-Sánchez, V., Serrano-Heras, G., Galán-Moya, E. M., Serrano-Oviedo, L., Montero, J. C., Burgos, M., Llopis, J., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2017a). Targeting basal-like breast tumors with bromodomain and extraterminal domain (BET) and polo-like kinase inhibitors. *Oncotarget*, 8(12), 19478-19490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14465>

Nieto-Jiménez, C., Alcaraz-Sanabria, A., Pérez-Peña, J., Corrales-Sánchez, V., Serrano-Heras, G., Galán-Moya, E. M., Serrano-Oviedo, L., Montero, J. C., Burgos, M., Llopis, J., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2017b). Targeting basal-like breast tumors with bromodomain and extraterminal domain (BET) and polo-like kinase inhibitors. *Oncotarget*, 8(12), 19478-19490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14465>

Nieto-Jimenez, C., Galan-Moya, E. M., Corrales-Sanchez, V., Noblejas-Lopez, M. D. M., Burgos, M., Domingo, B., Montero, J. C., Gomez-Juarez, M., Picazo-Martinez, M. G., Esparis-Ogando, A., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2020). Inhibition of the mitotic kinase PLK1 overcomes therapeutic resistance to BET inhibitors in triple negative breast cancer. *Cancer Letters*, 491, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.020>

Nilendu, P., Kumar, A., Kumar, A., Pal, J. K., & Sharma, N. K. (2018). Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: A hard nut to crack. *International Journal of Cancer*, 142(1), 7-17. <https://doi.org/10.1002/ijc.30898>

Niu, N., & Wang, L. (2015). In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics*, 16(3), 273-285. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.170>

Novak, D., Hüser, L., Elton, J. J., Umansky, V., Altevogt, P., & Utikal, J. (2019). SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007>

Nuncia-Cantarero, M., Martínez-Canales, S., Andrés-Pretel, F., Santpere, G., Ocaña, A., & Galan-Moya, E. M. (2018). Functional transcriptomic annotation and protein-protein interaction network analysis identify NEK2, BIRC5, and TOP2A as potential targets in obese patients with luminal A breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 168(3), 613-623. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4652-3>

Ocaña, A., Nieto-Jiménez, C., & Pandiella, A. (2017). BET inhibitors as novel therapeutic agents in breast cancer. *Oncotarget*, 8(41), 71285-71291. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19744>

O'Reilly, E. A., Gubbins, L., Sharma, S., Tully, R., Guang, M. H. Z., Weiner-Gorzal, K., McCaffrey, J., Harrison, M., Furlong, F., Kell, M., & McCann, A. (2015). The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical*, 3, 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.03.003>

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Reviews*, 8(2), 98-101.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

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, J. H., Ahn, J.-H., & Kim, S.-B. (2018). How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): From the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. *ESMO Open*, 3(Suppl 1), e000357. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000357>

Pérez-Peña, J., Serrano-Heras, G., Montero, J. C., Corrales-Sánchez, V., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2016). In Silico Analysis Guides Selection of BET Inhibitors for Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8), 1823-1833. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0004>

Pérez-Salvia, M., & Esteller, M. (2016). Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics*, 12(5), 323-339. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1265710>

Phillips, S. L., Williams, C. B., Zambrano, J. N., Williams, C. J., & Yeh, E. S. (2017). Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (Review). *International Journal of Oncology*, 51(4), 1005-1013. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4114>

Pistone Creydt, V., Fletcher, S. J., Giudice, J., Bruzzone, A., Chasseing, N. A., Gonzalez, E. G., Sacca, P. A., & Calvo, J. C. (2013). Human adipose tissue from normal and tumoral breast regulates the behavior of mammary epithelial cells. *Clinical and Translational Oncology*, 15(2), 124-131. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0896-x>

Platt, G. M., Simpson, G. R., Mitnacht, S., & Schulz, T. F. (1999). Latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with RING3, a homolog of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene. *Journal of Virology*, 73(12), 9789-9795. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.9789-9795.1999>

P O'Malley, D. (2020). Recent advances in inhibitors of C-terminal SRC kinase. *Future Medicinal Chemistry*, 12(16), 1447-1449. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0125>

Priya, N., Sarcar, S., Majumdar, A. S., & SundarRaj, S. (2014). Explant culture: A simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(9), 706-716. <https://doi.org/10.1002/term.1569>

Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S.-F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*, 13(3), 325-338. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>

Qin, J.-J., Yan, L., Zhang, J., & Zhang, W.-D. (2019). STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: A systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1206-z>

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression

and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423-1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>

R, W., & A, Z. (2017, noviembre). *Metalloprotease-dependent activation of EGFR modulates CD44 +/CD24—Populations in triple negative breast cancer cells through the MEK/ERK pathway*. *Breast cancer research and treatment; Breast Cancer Res Treat*. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4440-0>

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Badve, S., & Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(4), 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

Ritter, A., Friemel, A., Fornoff, F., Adjan, M., Solbach, C., Yuan, J., & Louwen, F. (2015). Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(33), 34475-34493. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5922>

Riveiro, M. E., Astorgues-Xerri, L., Vazquez, R., Frapolli, R., Kwee, I., Rinaldi, A., Odore, E., Rezai, K., Bekradda, M., Inghirami, G., D'Incalci, M., Noel, K., Cvitkovic, E., Raymond, E., & Bertoni, F. (2016). OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, exhibits antitumor activity in non-small cell and small cell lung cancer models harboring different oncogenic mutations. *Oncotarget*, 7(51), 84675-84687. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13181>

Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., & Coleman, W. B. (2013a). Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1113-1124. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>

Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., & Coleman, W. B. (2013b). Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1113-1124. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>

Rivera-Torres, J., & San José, E. (2019). Src Tyrosine Kinase Inhibitors: New Perspectives on Their Immune, Antiviral, and Senotherapeutic Potential. *Frontiers in Pharmacology*, 10,

1011. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01011>

Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651-672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>

Roskoski, R. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(4), 1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.171>

Rowan, B. G., Gimble, J. M., Sheng, M., Anbalagan, M., Jones, R. K., Frazier, T. P., Asher, M., Lacayo, E. A., Friedlander, P. L., Kutner, R., & Chiu, E. S. (2014). Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PloS One*, 9(2), e89595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089595>

Ruan, K., Bao, S., & Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(14), 2219-2230. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0013-7>

Sahai, V., Redig, A. J., Collier, K. A., Eckerdt, F. D., & Munshi, H. G. (2016). Targeting BET bromodomain proteins in solid tumors. *Oncotarget*, 7(33), 53997-54009. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9804>

Sahni, J. M., & Keri, R. A. (2018). Targeting Bromodomain and Extraterminal Proteins in Breast Cancer. *Pharmacological research*, 129, 156-176. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.015>

Serrano-Oviedo, L., Nuncia-Cantarero, M., Morcillo-Garcia, S., Nieto-Jimenez, C., Burgos, M., Corrales-Sanchez, V., Perez-Peña, J., Gyórfy, B., Ocaña, A., & Galán-Moya, E. M. (2020). Identification of a stemness-related gene panel associated with BET inhibition in triple negative breast cancer. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00497-6>

Shah, N. H., Amacher, J. F., Nocka, L. M., & Kuriyan, J. (2018). The Src module: An ancient scaffold in the evolution of cytoplasmic tyrosine kinases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 53(5), 535-563. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1495173>

Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 21(9), 1050-1062. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0067>

Shi, J., & Vakoc, C. R. (2014). The Mechanisms behind the Therapeutic Activity of BET Bromodomain Inhibition. *Molecular Cell*, 54(5), 728-736. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.016>

Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(10), 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>

Simone V., D'Avenia M., Argentiero A., Felici C., Rizzo F. M., Pergola G. D., & Silvestris F. (2016). Obesity and Breast Cancer: Molecular Interconnections and Potential Clinical Applications. *The Oncologist*, 21(4), 404-417. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0351>

Skolekova, S., Matuskova, M., Bohac, M., Toro, L., Durinikova, E., Tyciakova, S., Demkova, L., Gursky, J., & Kucerova, L. (2016). Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0127-0>

Smith, S. G., & Zhou, M.-M. (2016). Bromodomains as targets for therapeutic intervention. *Drug Discovery Today: Technologies*, 19, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.09.002>

Stathis, A., & Bertoni, F. (2018). BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment. *Cancer Discovery*, 8(1), 24-36. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0605>

Stover, D. G., Bell, C. F., & Tolaney, S. M. (2016). Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy Considerations for Triple-Negative Breast Cancer. *American Journal of Hematology / Oncology®*, 12(3).  
<https://www.gotoper.com/publications/ajho/2016/2016mar/neoadjuvant-and-adjuvant-chemotherapy-considerations-for-triple-negative-breast-cancer>

Stratikopoulos, E. E., Dendy, M., Szabolcs, M., Khaykin, A. J., Lefebvre, C., Zhou, M.-M., & Parsons, R. (2015). Kinase and BET Inhibitors Together Clamp Inhibition of PI3K Signaling and Overcome Resistance to Therapy. *Cancer cell*, 27(6), 837-851.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.006>

Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T. M., & Hall, B. M. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(33), 2940-2947.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2009.180>

Tahara, R. K., Brewer, T. M., Theriault, R. L., & Ueno, N. T. (2019). Bone Metastasis of Breast Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1152, 105-129.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_7)

Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649-5669.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>

Tandon, M., Othman, A. H., Ashok, V., Stein, G. S., & Pratap, J. (2018). The role of Runx2 in facilitating autophagy in metastatic breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 559-571. <https://doi.org/10.1002/jcp.25916>

TARPLEY, M., ABDISSA, T. T., JOHNSON, G. L., & SCOTT, J. E. (2014). Bosutinib Reduces the Efficacy of Dasatinib in Triple-negative Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer research*, 34(4), 1629-1635.



Thomas, A., Khan, S. A., Chrischilles, E. A., & Schroeder, M. C. (2016). Initial Surgery and Survival in Stage IV Breast Cancer in the United States, 1988–2011. *JAMA surgery*, *151*(5), 424-431. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2015.4539>

Thorpe, L. M., Yuzugullu, H., & Zhao, J. J. (2015). PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews. Cancer*, *15*(1), 7-24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>

Tian, J., Raffa, F. A., Dai, M., Moamer, A., Khadang, B., Hachim, I. Y., Bakdounes, K., Ali, S., Jean-Claude, B., & Lebrun, J.-J. (2018). Dasatinib sensitises triple negative breast cancer cells to chemotherapy by targeting breast cancer stem cells. *British Journal of Cancer*, *119*(12), 1495-1507. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0287-3>

Tkach, M., Rosembliit, C., Rivas, M. A., Proietti, C. J., Flaqué, M. C. D., Mercogliano, M. F., Beguelin, W., Maronna, E., Guzmán, P., Gercovich, F. G., Deza, E. G., Elizalde, P. V., & Schillaci, R. (2013). P42/p44 MAPK-mediated Stat3Ser727 phosphorylation is required for progesterin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth. *Endocrine-Related Cancer*, *20*(2), 197-212. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0194>

Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K.-H. (2017). Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer*, *16*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0596-9>

Tolomeo, M., & Cascio, A. (2021). The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 603. <https://doi.org/10.3390/ijms22020603>

van Vlerken, L. E., Kiefer, C. M., Morehouse, C., Li, Y., Groves, C., Wilson, S. D., Yao, Y., Hollingsworth, R. E., & Hurt, E. M. (2013). EZH2 is required for breast and pancreatic cancer stem cell maintenance and can be used as a functional cancer stem cell reporter. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(1), 43-52. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0036>

Velaei, K., Samadi, N., Barazvan, B., & Rad, J. S. (2016). Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *The Breast*, *30*, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.002>

Verbeek, B. S., Vroom, T. M., Adriaansen-Slot, S. S., Ottenhoff-Kalff, A. E., Geertzema, J. G., Hennipman, A., & Rijksen, G. (1996). c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *The Journal of Pathology*, 180(4), 383-388. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199612\)180:4<383::AID-PATH686>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199612)180:4<383::AID-PATH686>3.0.CO;2-N)

von Minckwitz, G., Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S. D., Eidtmann, H., Fasching, P. A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G. E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., & Loibl, S. (2012). Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(15), 1796-1804. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.8595>

Voronkova, M. A., Luanpitpong, S., Rojanasakul, L. W., Castranova, V., Dinu, C. Z., Riedel, H., & Rojanasakul, Y. (2017). SOX9 Regulates Cancer Stem-Like Properties and Metastatic Potential of Single-Walled Carbon Nanotube-Exposed Cells. *Scientific Reports*, 7(1), 11653. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12037-8>

Wainwright, E. N., & Scaffidi, P. (2017). Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. *Trends in Cancer*, 3(5), 372-386. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.004>

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells International*, 2018, 3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>

Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761-773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>

Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141-160. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325-2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>

Warwick, L., Baugh, E., Cardoso, F., Giles, R. H., Filicevas, A., Fox, J., Oliver, K. R., Reid, F., Isaacson, J., Spiegel, A., Ventura, R., Sheahan, N., & MacKay, C. (2021). Cancer care during COVID-19: Data from 157 patient organizations. *Journal of Clinical Oncology*, 39(15\_suppl), e18564-e18564. [https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15\\_suppl.e18564](https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e18564)

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), 2677-2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>

Wein, L., & Loi, S. (2017). Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 34 Suppl 1, S27-S30. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.023>

Wilson, G. R., Cramer, A., Welman, A., Knox, F., Swindell, R., Kawakatsu, H., Clarke, R. B., Dive, C., & Bundred, N. J. (2006). Activated c-SRC in ductal carcinoma in situ correlates with high tumour grade, high proliferation and HER2 positivity. *British Journal of Cancer*, 95(10), 1410-1414. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603444>

Wu, T., Pinto, H. B., Kamikawa, Y. F., & Donohoe, M. E. (2015). The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem Cell Reports*, 4(3), 390-403. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.012>

Yin, S., Cheryan, V. T., Xu, L., Rishi, A. K., & Reddy, K. B. (2017). Myc mediates cancer stem-like cells and EMT changes in triple negative breast cancers cells. *PloS One*, 12(8), e0183578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183578>

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

Zhang, S., & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: Turning promise into triumph. *Trends in pharmacological sciences*, 33(3), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.11.002>

Zhang, X. H.-F., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M., Foekens, J. A., & Massagué, J. (2009). Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer cell*, 16(1), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.017>

Zhao, L., Duan, Y.-T., Lu, P., Zhang, Z.-J., Zheng, X.-K., Wang, J.-L., & Feng, W.-S. (2018). Epigenetic Targets and their Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(28), 2395-2419. <https://doi.org/10.2174/1568026619666181224095449>

Zhou, D., Liu, W., Liang, S., Sun, B., Liu, A., Cui, Z., Han, X., & Yuan, L. (2018). Apoptin-derived peptide reverses cisplatin resistance in gastric cancer through the PI3K–AKT signaling pathway. *Cancer Medicine*, 7(4), 1369-1383. <https://doi.org/10.1002/cam4.1380>

Zimta, A.-A., Tigu, A. B., Muntean, M., Cenariu, D., Slaby, O., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Molecular Links between Central Obesity and Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215364>



A N E X O I

Artículos desarrollados durante la tesis doctoral



# Anexo I

---

## Artículos desarrollados durante la tesis doctoral

Martínez-Canales, S., López de Rodas, M., **Nuncia-Cantarero, M.**, Páez, R., Amir, E., Gyórfy, B., Pandiella, A., Galán-Moya, E. M., & Ocaña, A. (2018). Functional transcriptomic annotation and protein-protein interaction analysis identify EZH2 and UBE2C as key upregulated proteins in ovarian cancer. *Cancer Medicine*, 7(5), 1896-1907. <https://doi.org/10.1002/cam4.1406>

Morcillo-Garcia, S., Noblejas-Lopez, M. D. M., Nieto-Jimenez, C., Perez-Peña, J., **Nuncia-Cantarero, M.**, Gyórfy, B., Amir, E., Pandiella, A., Galan-Moya, E. M., & Ocana, A. (2019). Genetic mutational status of genes regulating epigenetics: Role of the histone methyltransferase KMT2D in triple negative breast tumors. *PloS One*, 14(4), e0209134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134>

Nieto-Jimenez, C., Alcaraz-Sanabria, A., Martinez-Canales, S., Corrales-Sanchez, V., Montero, J. C., Burgos, M., **Nuncia-Cantarero, M.**, Pandiella, A., Galan-Moya, E. M., & Ocaña, A. (2020). Checkpoint Kinase 1 Pharmacological Inhibition Synergizes with DNA-Damaging Agents and Overcomes Platinum Resistance in Basal-Like Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239034>

Noblejas-López, M. D. M., Morcillo-García, S., Nieto-Jiménez, C., **Nuncia-Cantarero, M.**, Gyórfy, B., Galan-Moya, E. M., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2018). Evaluation of transcriptionally regulated genes identifies NCOR1 in hormone receptor negative breast tumors and lung adenocarcinomas as a potential tumor suppressor gene. *PloS One*, 13(11), e0207776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776>

Noblejas-López, M. D. M., Nieto-Jiménez, C., Morcillo García, S., Pérez-Peña, J., **Nuncia-Cantarero, M.**, Andrés-Pretel, F., Galán-Moya, E. M., Amir, E., Pandiella, A., Gyórfy, B., & Ocaña, A. (2019). Expression of MHC class I, HLA-A and HLA-B identifies immune-activated breast tumors with favorable outcome. *Oncoimmunology*, 8(10), e1629780. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1629780>

**Nuncia-Cantarero, M.**, Martínez-Canales, S., Andrés-Pretel, F., Santpere, G., Ocaña, A., & Galan-Moya, E. M. (2018). Functional transcriptomic annotation and protein-protein interaction network analysis identify NEK2, BIRC5, and TOP2A as potential targets in obese patients with luminal A breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 168(3), 613-623. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4652-3>

Santiago, J. L., Muñoz-Rodríguez, J. R., Cruz-Morcillo, M. A. de la, Villar-Rodríguez, C., Gonzalez-Lopez, L., Aguado, C., **Nuncia-Cantarero, M.**, Redondo-Calvo, F. J., Perez-Ortiz, J. M., & Galan-Moya, E. M. (2021). Characterization of Permeability Barrier Dysfunction in a Murine Model of Cutaneous Field Cancerization Following Chronic UV-B Irradiation: Implications for the Pathogenesis of Skin Cancer. *Cancers*, 13(16), 3935. <https://doi.org/10.3390/cancers13163935>

Serrano-Oviedo, L., **Nuncia-Cantarero, M.**, Morcillo-Garcia, S., Nieto-Jimenez, C., Burgos, M., Corrales-Sanchez, V., Perez-Peña, J., Gyórfy, B., Ocaña, A., & Galán-Moya, E. M. (2020). Identification of a stemness-related gene panel associated with BET inhibition in triple negative breast cancer. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00497-6>





# Identification of a stemness-related gene panel associated with BET inhibition in triple negative breast cancer

Leticia Serrano-Oviedo<sup>1,2</sup> · Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1</sup> · Sara Morcillo-García<sup>1</sup> · Cristina Nieto-Jimenez<sup>1,2</sup> · Miguel Burgos<sup>2,3</sup> · Veronica Corrales-Sanchez<sup>2</sup> · Javier Perez-Peña<sup>1,2</sup> · Balázs Györfy<sup>4</sup> · Alberto Ocaña<sup>1,2,3,5</sup> · Eva María Galán-Moya<sup>1,3</sup>

Accepted: 20 February 2020 / Published online: 12 March 2020  
© The Author(s) 2020

## Abstract

**Purpose** Triple negative breast cancers (TNBCs) are enriched in cells bearing stem-like features, i.e., cancer stem cells (CSCs), which underlie cancer progression. Thus, targeting stemness may be an interesting treatment approach. The epigenetic machinery is crucial for maintaining the stemness phenotype. Bromodomain and extra-terminal domain (BET) epigenetic reader family members are emerging as novel targets for cancer therapy, and have already shown preclinical effects in breast cancer. Here, we aimed to evaluate the effect of the BET inhibitor JQ1 on stemness in TNBC.

**Methods** Transcriptomic, functional annotation and qRT-PCR studies were performed on JQ1-exposed TNBC cells in culture. The results obtained were confirmed in spheroids and spheroid-derived tumours. In addition, limiting dilution, secondary and tertiary tumour sphere formation, matrigel invasion, immunofluorescence and flow cytometry assays were performed to evaluate the effect of JQ1 on CSC features. For clinical outcome analyses, the online tool Kaplan-Meier Plotter and an integrated response database were used.

**Results** We found that JQ1 modified the expression of stemness-related genes in two TNBC-derived cell lines, MDA-MB-231 and BT549. Among these changes, the *CD44* Antigen/*CD24* Antigen (*CD44/CD24*) ratio and Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1 (*ALDH1A1*) expression level, i.e., both classical stemness markers, were found to be decreased by JQ1. Using a validated spheroid model to mimic the intrinsic characteristics of CSCs, we found that JQ1 decreased surface *CD44* expression, inhibited self-renewal and invasion, and induced cell cycle arrest in G0/G1, thereby altering the stemness phenotype. We also found associations between four of the identified stemness genes, Gap Junction Protein Alpha 1 (*GJA1*), *CD24*, Epithelial Adhesion Molecule (*EPCAM*) and SRY-related HMG-box gene 9 (*SOX9*), and a worse TNBC patient outcome. The expression of another two of the stemness-related genes was found to be decreased by JQ1, i.e., ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (*ABCG2*) and *RUNX2*, and predicted a low response to chemotherapy in TNBC patients, which supports a role for *RUNX2* as a potential predictive marker for chemotherapy response in TNBC.

**Conclusions** We identified a stemness-related gene panel associated with JQ1 and describe how this inhibitor modifies the stemness landscape in TNBC. Therefore, we propose a novel role for JQ1 as a stemness-targeting drug. Loss of the stem cell

---

Leticia Serrano-Oviedo and Miriam Nuncia-Cantarero contributed equally to this work.

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13402-020-00497-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alberto Ocaña  
alberto.ocana@salud.madrid.org

✉ Eva María Galán-Moya  
EvaMaria.Galan@uclm.es

<sup>1</sup> Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha: Campus de Albacete, C/ Almansa 14, 02008 Albacete, Spain

<sup>2</sup> Translational Research Unit, CIBERONC and Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, Spain

<sup>3</sup> Physiology and Cell Dynamics Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha: Campus de Albacete, Albacete, Spain

<sup>4</sup> Semmelweis University 2nd Dept. of Pediatrics, and MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

<sup>5</sup> Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos and IDISSC, Madrid, Spain

phenotype via JQ1 treatment could lead to less aggressive and more chemo-sensitive tumours, reflecting a better patient prognosis. Thus, the identified gene panel may be of interest for the clinical management of patients with aggressive TNBC.

**Keywords** Triple negative breast cancer · BET inhibitors · Biomarkers · Targeted therapy · Cancer stem cells · Tumour heterogeneity · Stemness

## 1 Introduction

Cancer progression involves loss of differentiation and acquisition of multipotency and asymmetric division characteristics [1]. Accordingly, some cancer cells adopt stem cell-like features, such as self-renewal and the ability to differentiate into multiple cell lineages from the tissue of origin [2]. This subpopulation of cells also shows an increased expression of stem cell-related genes [3] and, as such, they have been dubbed cancer stem cells (CSCs). CSCs participate in a number of processes during cancer progression, i.e., they are intrinsically resistant to standard chemotherapies, play a central role in cancer metastasis and appear to be responsible for tumour recurrence [4–6]. Together, these characteristics are known as cancer stemness [7].

Also, abnormal epigenetic gene regulation may contribute to cancer initiation and progression, and affect the stemness phenotype [8, 9]. Through a deregulated epigenetic program, tumours can increase the number of CSCs, suggesting that the epigenetic machinery is essential for the maintenance of stem cell identity. Consequently, targeting epigenetic-related mechanisms may be a promising strategy to inhibit this cancer cell subpopulation [10]. Several epigenetic inhibitors are currently under clinical evaluation for cancer treatment, among which inhibitors of histone deacetylases (HDACs), enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2), DNA methyltransferases (DNMTs), lysine-specific demethylase 1 (LSD1), and bromodomain and extra-terminal domain (BET) family proteins [11, 12]. The BET family of proteins, including BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT, plays a crucial role in epigenetic regulation of gene transcription through the ability to recognise histone acetylated lysine residues. These epigenetic readers have recently emerged as new therapeutic targets for cancer, as well as for metabolic and inflammatory diseases [8, 13, 14]. These epigenetic drugs exhibit antiproliferative effects through a complex mechanism that involves gene transcription inhibition, cell cycle arrest and, therefore, altered cell division. In addition, BET inhibitors (BETi) have shown preclinical activity in breast cancer [13–15], although, the use of BETi as single agents in clinical trials has so far yielded modest results [15].

Triple negative breast cancer (TNBC) is a subtype of breast cancer for which currently limited therapeutic options exist. This is because it lacks specific targets that can be used to guide therapy. Although aggressive chemotherapy can lead to an initial high response rate, TNBC patients often develop resistance to chemotherapy, and distant relapses are frequently observed

[16–18]. Consequently, effective treatment of TNBC remains an unmet need and the identification of targets to treat this subtype is essential for improved therapeutic efficacy. Resistance to chemotherapy usually occurs in CSCs, which exhibit a low proliferation rate [5]. Similarly, tumour relapses are associated with the presence of dormant CSCs [19]. As such CSCs are, at least partly, considered to be responsible for the high degree of therapy resistance in TNBC [20]. Therefore, targeting stemness may be a potential strategy to address this disease.

Here, through transcriptomic and functional annotation analyses, we identified a panel of stemness-related genes that can efficiently be targeted with the BETi JQ1. Moreover, we found that JQ1 impaired several CSC features in a three-dimensional (3D) model of TNBC, including growth under non-adherent conditions, self-renewal and expression of stemness marker genes. Importantly, we found that JQ1-mediated downregulation of this stemness signature was linked to improved TNBC patient prognosis, and that two of the genes identified, *ABCG2* and *RUNX2*, have the ability to predict response to chemotherapy.

## 2 Material and methods

### 2.1 Cell culture and drug compounds

MDA-MB-231 and BT-549 TNBC cells were grown as adherent monolayers in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% Foetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine (all from Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C.

Spheroid models were designed as follows: a monolayer of adherent MDA-MB-231 or BT-549 cells was extensively washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) and gently scraped to detach them from the plastic surface. Next, the cells were centrifuged at 900 rpm for 5 min and transferred to non-adherent plates containing a CSC-defined medium (FBS-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham, DMEM F-12) (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, B27 supplement (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.), EFG (20 ng/ml) and FGF (20 ng/ml) (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for at least 21 days to generate primary spheroids. The BETi JQ1 and OTX-015 were purchased from Selleckchem company.

## 2.2 Transcriptomic, functional enrichment and gene expression analyses

MDA-MB-231 cells were exposed to JQ1 (500 nM) for 12 and 24 h. Next, RNA was isolated using a Qiagen RNeasy kit following the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed on the RNA samples. Transcriptomic analyses were performed using an Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 at the Genomic Platform of the Cancer Institute of Salamanca. To identify cellular functions altered by JQ1 treatment, the differentially expressed genes were analysed using DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), a tool to perform gene set enrichment analyses. An adjusted  $p$  value  $< 0.05$  was used to select the five highest ranked enriched gene-sets. Next, deregulated genes were classified according to their involvement in a wide range of cellular functions using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software available at <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>. Among the potentially affected functions, we searched for those related to cancer stemness. This included all gene sets containing the words "differentiation" or "stem". The resulting list of JQ1-deregulated gene transcripts was then scrutinized to identify cancer stemness-related markers.

## 2.3 Quantitative RT-PCR

RNA isolation of all samples (MDA-MB-231 or BT-549 adherent, or spheroid cultures and MDA-MB-231 spheroid-derived tumours) was performed using a RNeasy Mini kit (Qiagen), as indicated above. RNA concentrations and purities were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Next, 1  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using a RevertAidHMinus First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) in a thermocycler (Bio-Rad) under the following reaction conditions: 65 °C for 5 min, 42 °C for 60 min, and 70 °C for 10 min. The resulting cDNAs were subjected to quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis using a Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) in a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). The conditions used included an initial step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and a final step at 60 °C for 1 min. Each sample was analysed in triplicate, and cycle threshold (Ct) values of transcripts were determined using StepOne Software v.2.1. Ct values were calculated using *GAPDH* as reference. Untreated samples were used as controls to determine the relative fold-changes in messenger RNA (mRNA) expression. The primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

## 2.4 Immunofluorescence assays

MDA-MB-231-derived spheroids were treated with JQ1 (200 nM) and 72 h later floating spheroids were collected and gently dropped on a water repelling circle drawn on a poly-lysine-treated slide (DAKO). Within one minute, excess liquid was removed and slide-attached spheroids were fixed for 15 min with paraformaldehyde (4%). After a PBS wash, samples were blocked with Bovine Serum Albumin (BSA) (5%) for 30 min and, next, incubated with R-phycoerythrin (PE)-coupled *CD44* Antigen (CD44) (R&D Systems) for 60 min (3% BSA). Extensive washes with PBS were performed before mounting with Fluoroshield (Sigma Aldrich, Thermo Fisher Scientific Inc.). 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich) was used for the staining of nuclei. Fluorescence imaging of spheroids was performed using confocal microscopy (Zeiss LSM 710).

## 2.5 Limiting dilution and secondary and tertiary tumour sphere formation assays

For the limiting dilution assays (LDA), MDA-MB-231 and BT-549 primary tumour spheres (TS), obtained from 21-day old spheroids, were mechanically disaggregated and counted before being seeded in non-adherent 96-well plates (Corning). Next, serial dilutions were performed to achieve 200 cells/well down to 1 cell/well. Spheroid formation was monitored until day 21 by determining the number of TS per well.

For the secondary and tertiary TS formation assays, primary TS were mechanically dissociated after which 200,000 cells were cultured in ultralow attachment 100 mm plates (Falcon) in the presence of JQ1 (200 nM) for 3 days. Next, the number of secondary TS per plate were determined. Secondary TS were again dissociated and left in the presence of the drug until day 6, at which the number of tertiary TS per plate was determined. TS pictures were taken at the two time points using an inverted microscope (Nikon).

## 2.6 Matrigel invasion assays

Cells from freshly dissociated MDA-MB-231 and BT-549 spheroids (10,000 cells) were seeded on a thin layer of matrigel in 48-well plates. After overnight incubation, the cells were exposed to JQ1 (200 nM), and 3 days later 3D invading structures were visualized under an inverted Nikon Eclipse TS1000 (20x) optical microscope.

## 2.7 Flow cytometry assays

For cell cycle analyses, MDA-MB-231 TS (500,000 cells) were cultured for 24 h before exposure to JQ1 (100 and 200 nM) for 1 day. Floating cells were collected and washed twice with cold PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol for 30 min

and, next, centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The resulting cell pellets were washed in PBS containing 2% BSA to prevent cell aggregation prior to incubation with propidium iodide (PI)/RNase staining solution (Immunostep S.L., Salamanca, Spain) in the dark for 1 h at 4 °C. Next, the samples were analysed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and the percentage of cells in each cell cycle phase was determined by plotting spheroid DNA content against cell number using FACS Diva software.

For apoptosis evaluations, MDA-MB-231 TS (300,000 cells) were cultured for 24 h before exposure to JQ1 (100 and 200 nM). Three days later, floating cells were collected, centrifuged (900 rpm, 5 min), and washed twice with ice-cold PBS before staining in 5 ml Annexin V/DT-634 (Immunostep S.L.) in 1x binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaOH, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) for 1 h in the dark at room temperature. Viable cells, as indicated by negative Annexin V staining, were determined using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

## 2.8 In vivo studies

Balb/c nude mice (female, 6 weeks,  $n = 6$ /group) were orthotopically injected with freshly dissociated MDA-MB-231-derived spheroids ( $2 \times 10^6$  cells). 14 days later, when the tumours reached  $\sim 250 \text{ mm}^3$  (Tumour volume = (length  $\times$  width<sup>2</sup>)/2), the mice were treated daily for three days with JQ1 (50 mg/kg, intravenously). Next, the tumours were harvested and cryogenically stored until qRT-PCR analyses were performed (see above). All animal studies were carried out according to protocols approved by the ethics committee on animal experimentation of Castilla-La Mancha University (Procedure PR-2017-03-07).

## 2.9 Clinical outcome analyses

The Kaplan-Meier (KM) Plotter Online Tool was used to analyse relationships between the expression of JQ1-deregulated stemness genes and TNBC patient clinical outcome (<http://kmplot.com/analysis/>, Relapse Free Survival (RFS), basal-like breast cancer; data accessed: 11/04/18). By using this tool, the effect of 54,675 genes on survival was assessed using 5143 breast cancer samples. For the analyses, patients were separated according to best cut-off values (expression range of the signature = 170–11,816), and the following probes were used: Epithelial Adhesion Molecule (*EPCAM*) (201839\_s\_at), SRY-related HMG-box gene 9 (*SOX9*) (202936\_s\_at), Integrin  $\alpha 6$  (*ITGA6*) (201656\_at), Gap Junction Protein Alpha 1 (*GJAI*) (201667\_at), V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (*MYC*) (202431\_s\_at), *ABCG2* (209735\_at), *EZH2* (203358\_s\_at), Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) (232231\_at), Follistatin Like 1 (*FSTL1*) (208782\_at), Protein Inhibitor of Activated STAT 3 (*PIAS3*) (203035\_s\_at),

Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1 (*ALDH1A1*) (212224\_at), *CD24* Antigen (*CD24*) (266\_s\_at), and *CD44* (212063\_at). Only deregulated genes significantly associated with detrimental outcome (Hazard Ratio (HR)  $> 1$  and  $p$  value  $\leq 0.05$ ) were used for subsequent analyses ( $n = 4$ ). This tool was also used to determine RFS in combined analyses of the four poor prognosis-linked genes. All the analyses were performed independently by two authors (SMG and MNC) and reviewed by a third author (EMGM). No discrepancies were noted.

We established a database of transcriptomic datasets with available response and treatment data to study the relationship between JQ1-deregulated stemness gene expression and clinical outcome (RFS) regarding the chemotherapy regimen followed (5 years post-treatment). Through a Pubmed search using the keywords “breast cancer”, “survival”, “treatment”, and “response”, we identified 2108 breast cancer cases that received chemotherapy and for whom the gene expression levels were measured using Affymetrix HGU133A and HGU133A plus 2.0 microarrays. Gene expression levels were studied for patients who received chemotherapy with Taxane, Anthracycline, Ixabepilone, CMF (Cyclophosphamide / Methotrexate / Fluorouracil), FAC (Fluorouracil / Adriamycin / Cytosine), and FEC (Fluorouracil / Epirubicin / Cyclophosphamide).

## 2.10 BETi-associated stemness interactome analysis

The online tool STRING (<http://www.string-db.org>) was used to construct an interactome map of JQ1 stemness deregulated genes (STRING v10, data accessed: 14/03/18). *Node degree*: average number of interactions; *Clustering coefficient*: indicates the tendency of the network to form clusters. The closer the local clustering coefficient is to 1, the more likely it is for the network to form clusters; *PPI enrichment p value*: indicates the statistical significance.

## 2.11 Statistical analysis

All in vitro experiments were performed at least three times and, except for the flow cytometry studies, each condition was prepared in triplicate. Two-way ANOVA and Student's test were used for the statistical analyses ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ ).

## 3 Results

### 3.1 JQ1 modifies the expression of stemness-related genes

First, molecular functions modified by BET inhibition were explored at the transcriptomic level, with a special focus on those related to stemness. To this end, MDA-MB-231 cells were treated with JQ1 for 12 or 24 h. Next, mRNA profiling



analysis was performed using an Affymetrix Transcriptome Array 2.0. In total 4652 and 2530 deregulated transcripts were found at 12 and 24 h, respectively. A preliminary analysis performed with the functional annotation tool DAVID revealed “Regulation of cell differentiation” as one of most ranked deregulated functions upon JQ1 treatment (Supplementary Fig. 1). Further functional enrichment analyses of the latter time point using GSEA software confirmed a decrease in several stem-related functions, including cell differentiation, stem cell differentiation, mesenchymal differentiation, regulation of cell differentiation, and endothelial cell differentiation (Fig. 1a and Supplementary Table 2).

Next, the list of deregulated transcripts was screened for genes known to be directly involved in stemness. This search uncovered a panel of 13 stem-related deregulated genes at 12 h and 13 genes at 24 h (Fig. 1b). The microarray-based results were corroborated by qRT-PCR, and we found that even low doses of JQ1 had an impact on the mRNA expression levels of the identified genes (Fig. 1c-g). To confirm its effect on the CSC population, the *CD44/CD24* ratio and the expression of *ALDH1A1*, both well-known CSC markers [21], were examined. We found that treatment with JQ1 induced decreases in the *CD44/CD24* ratio (Fig. 1c and g) together with a significant reduction in *ALDH1A1* expression levels (Fig. 1d and g). Additionally, downregulation of the stemness-related genes *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC*, *EPCAM* and *EZH2* (Fig. 1e) and other well-known stemness-associated genes, such as *GJA1*, *RUNX2*, *SOX9* and *FSTL1*, identified in the microarray screen, were confirmed to be downregulated upon JQ1 exposure by qRT-PCR, together with an increase in expression of the stemness repressor *PIAS3* (Fig. 1f). These data confirm the impact of JQ1 on cancer stemness and identify a panel of stemness genes associated with its application.

### 3.2 BET inhibition impairs stem cell-like features in TNBC spheroids

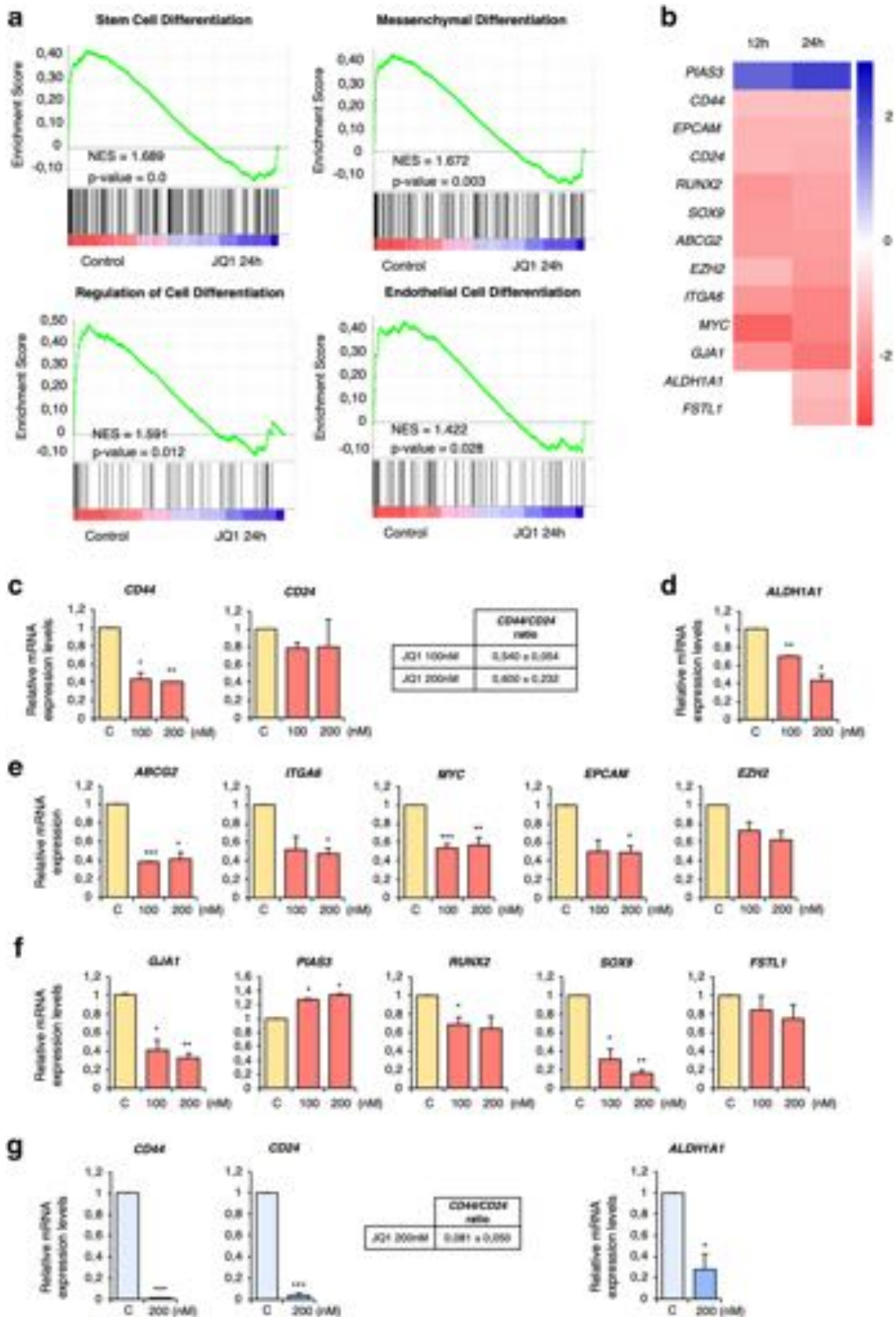
Previously, three-dimensional cell culture models have been shown to be of use for cancer research [22]. As a general rule these models, grown under particular conditions, are enriched in stem cell markers, turning them into good models to explore the effects of BETi on stemness. Thus, to further confirm that MDA-MB-231 and BT-549 spheroids can be employed as in vitro models for CSCs, the basal expression of the genes identified in the transcriptomic analyses were compared in the spheroids and the parental adherent cells. Marked increases in the mRNA levels of these stemness markers were observed in the spheroid cultures (Fig. 2a-b). Of note, in comparison to the adherent cells, the *CD44/CD24* ratio was increased in the two spheroid models, being more than ten-fold in the MDA-MB-231 spheroid model (*CD44/CD24* ratio = 11.48). Notably, *ALDH1A1* expression was also augmented in both 3D models, especially in the BT549 spheroid model. The expression

levels of other stem cell markers, such as Kuppel Like Factor 4 (*KLF4*) and SRY-Box2 (*SOX2*), were also found to be enhanced in the spheroid models (Fig. 2a).

Next, the effect of JQ1 on spheroid growth was explored. We found that exposure to JQ1 provoked a loss of the ability to grow in suspension, leading to the attachment of the spheroids to the culture plate surface, an indication of loss of stemness (Fig. 2c). Similar results were obtained with the BETi OTX-015 (Fig. 2c). The remaining spheroids were assessed for CD44 expression by immunofluorescence. We found that JQ1 induced a marked decrease in CD44 expression (Fig. 2d). To next evaluate the impact of JQ1 on MDA-MB-231 and BT-549 spheroid self-renewal capabilities, a limiting dilution assay (LDA) in the presence of the drug was carried out. In support of a negative effect of JQ1 on stemness, cells exposed to JQ1 exhibited a reduced capacity to form primary spheres (Fig. 2e). To further investigate its influence on this stemness hallmark, secondary and tertiary TS formation assays were performed. We found that treatment with JQ1 drastically reduced the number and size of the spheres in both models (Fig. 2f). Another stem cell-like feature, i.e., invasion potential, was investigated via 3D matrigel assays using MDA-MB-231 and BT-549 spheroids. In agreement with the previous results, we found that JQ1 impaired the invasive ability of spheroids, resulting in a decrease of the area of the 3D structures formed and a reduction of the number of ramifications (Fig. 2g). Finally, in line with previous results in MDA-MB-231 adherent cells [12], cell cycle analyses by flow cytometry revealed that JQ1 also induced G0/G1 arrest in spheroids (Fig. 2h), without any impact on cell death (Fig. 2i).

### 3.3 Expression of stemness-related genes in JQ1-treated spheroids and xenograft tumours

Next, we aimed to confirm the microarray-based findings using validated CSC-mimicking models. To this end, the effect of JQ1 on the expression of the identified stem cell-like and CSC-like genes was investigated in MDA-MB-231 and BT-549 spheroids. First, the impact of JQ1 on *CD44*, *CD24* and *ALDH1A1* expression was evaluated. JQ1 treatment led to a marked decrease of the *CD44/CD24* ratio ( $0.74 \pm 0.13$  and  $0.68 \pm 0.03$  for 100 and 200 nM, respectively, in the MDA-MB-231 model, and  $0.71 \pm 0.09$  for 200 nM in the BT-549 model), together with a dramatic decrease in *ALDH1A1* expression (Fig. 3d). The level of the stem cell marker *GJA1*, which is known to be enriched in CD44+ populations, was also reduced upon JQ1 exposure in the MDA-MB-231 model (Fig. 3a). Treatment with JQ1 efficiently downregulated the expression of the established CSC markers *EPCAM*, *RUNX2* and *ITGA6*, as well as the levels of other CSC-related genes, such as *MYC*, *EZH2*, *FSTL1* and *ABCG2* (Fig. 3b). The BETi also decreased the mRNA expression levels of the identified



◀ **Fig. 1** JQ1 affects stemness-related functions and downregulates the expression of stemness-related genes. **a.** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) identifying stemness-related biological functions. **b.** Manual screening uncovering 13 stemness-related genes. Heat map indicating fold changes of JQ1-deregulated genes compared to those in non-treated cells (incubated with vehicle). **c–g.** JQ1 effect on mRNA levels of the stemness-related genes identified in **b** corroborated by qRT-PCR. MDA-MB-231 (**c–f**) or BT549 (**g**) cells were treated with the indicated doses of JQ1 (24 h) after which qRT-PCR was performed for the indicated genes. **c** and **g.** *CD44* and *CD24* mRNA levels were used to calculate the *CD44/CD24* ratios in JQ1 exposed cells compared to control cells. **d** and **g** *ALDH1A1* mRNA levels were significantly downregulated in cells treated with JQ1 at both doses. **e.** JQ1 significantly decreased *ABCG2*, *ITGA6*, *MYC* and *EPCAM* levels in MDA-MB-231 cells, and modestly affected the *EZH2* level. **f.** *GJA1*, *PIAS3*, *RUNX2* and *SOX9* mRNA levels were significantly altered by JQ1, while just a slight decrease was found for *FSTL1*. The qRT-PCR conditions are described in material and methods. The results shown are averages of 3 independent experiments performed in triplicate. Student t-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$

TS-enriched classical stemness markers *SOX2* and *KLF4* (Fig. 3c).

To test the potential of JQ1 to control the identified stemness-related gene panel in a more physiological context, its effect on MDA-MB-231 spheroid-derived xenografts was evaluated. First, Balb/c nude mice (female, 6 weeks) were injected with freshly dissociated MDA-MB-231 spheroids. Two weeks later, tumour-bearing mice were treated with JQ1 during three consecutive days. Having completed the treatment regimen, the mRNA levels of the identified panel of genes were analysed in the collected tumours. Our results revealed that JQ1 also affects the expression of *MYC*, *ABCG2*, *ITGA6*, *EPCAM*, *SOX9*, *EZH2*, *GJA1*, *FSTL1* and *SOX2* in this in vivo model (Fig. 4a). It had also a negative effect on the expression of *CD24*, *CD44*, *ALDH1A*, *KLF4* and *RUNX2* (Fig. 4b), further supporting a potential role for this BETi to alter stemness.

### 3.4 JQ1-associated stemness signature predicts a worse patient outcome

To evaluate the role of the identified genes in tumour relapse, we decided to study their association with clinical outcome in TNBC. Using data contained in the Kaplan Meier (KM) plotter online tool [23], we found that high expression levels of *GJA1*, *CD24*, *EPCAM* and *SOX9* correlated with a poor recurrence free survival (RSF) (HR = 1.55 (1.21–2),  $p$  value = 0.00057; HR = 1.5 (1.14–1.97),  $p$  value = 0.0034; HR = 1.41 (1.09–1.83),  $p$  value = 0.0089; HR = 1.41 (1.09–1.81),  $p$  value = 0.0075, respectively) (Fig. 5a). Combined analysis of these four poor prognosis-associated genes revealed a higher potential to predict patient outcome than each gene individually (HR = 1.85 (1.35–2.53), log-rank  $p = 8.6e-05$ ) (Fig. 5b). No association with clinical outcome was observed for the remaining genes.

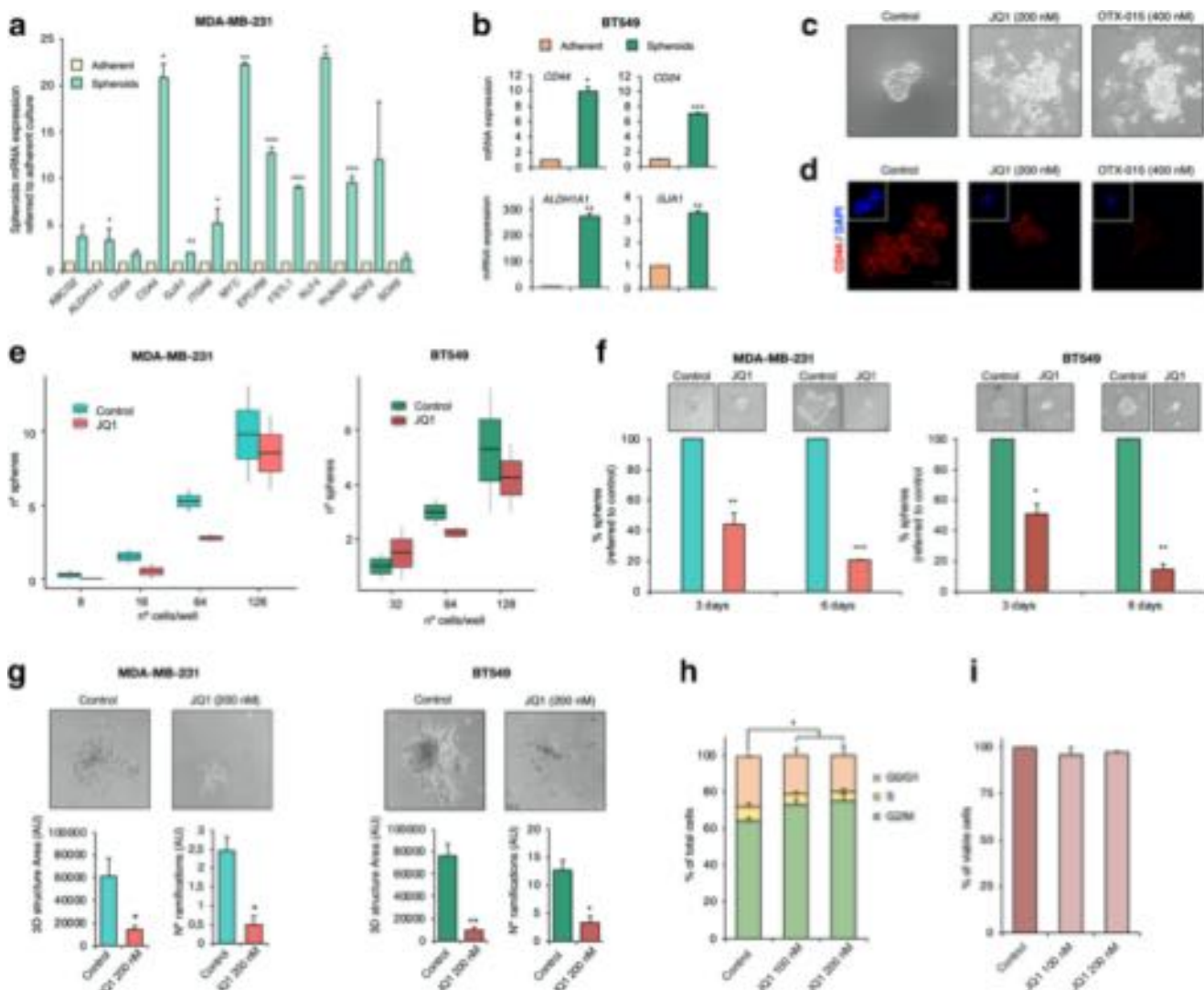
Next, potential correlations between the identified genes and patient responses to antitumor therapy were assessed. To do so, correlations between responses to therapy and gene expression in over 2108 patient samples were determined. High mRNA levels of the JQ1-altered stemness-related genes *ABCG2* and *RUNX2* were found to correlate with poorer responses to chemotherapy (Fig. 5c, Supplementary Fig. 2). Specifically, high levels of *RUNX2* expression were associated with low responses to any chemotherapy (Taxane, Anthracycline, Ixabepilone, CMF (Cyclophosphamide / Methotrexate / Fluorouracil), FAC (Fluorouracil / Adriamycin / Cytosine), and FEC (Fluorouracil / Epidoxorubicin / Cyclophosphamide). On the other hand *ABCG2*, a well-studied multi-drug resistance-associated gene [24], showed correlations with only two chemotherapies (Taxane and Anthracycline). Therefore, *RUNX2* may serve as a universal biomarker to predict chemotherapy response.

## 4 Discussion

The stemness landscape may define tumour aggressiveness through its effect on tumour progression and response to treatment. Accordingly, major interest in the study and measurement of stemness characteristics in cancer has recently evolved [8, 25] aimed at the development of novel strategies to target this feature. In breast cancer, stemness is a common characteristic that has been strongly associated with molecular and clinical features, especially in the TNBC subtype [9]. Indeed, TNBC is characterized by an enriched population of CSCs that confer intrinsic therapy resistance and aggressiveness [4, 20]. Therefore, the identification of drugs targeting CSCs may be a promising approach to treat TNBC.

BETi have recently emerged as novel epigenetic cancer treatment options, exhibiting pre-clinical efficacy in several malignancies, including acute myeloid leukaemia and breast cancer [15, 26]. In early stage clinical studies, good tolerability and signs of clinical activity for some of these compounds have been shown [15]. Among the different mechanisms of action, BETi have been found to play a role as regulators of self-renewal and stem cell signalling in some cancers, including medulloblastoma and head and neck squamous cell carcinoma [27, 28]. Although several studies have investigated the impact of BET protein inhibition in breast cancer [29–33], some of them evaluating its impact on epithelial-to-mesenchymal transition [34], little is known about the impact of their associated epigenetic drugs on cancer stemness in this cancer type. Here, we show how the BETi JQ1 alters the genetic stemness landscape, together with its associated features, and identify a stemness-related gene panel associated with BET inhibition in TNBC. By using different parameters to evaluate biomarkers of cancer stemness, such as overexpression of





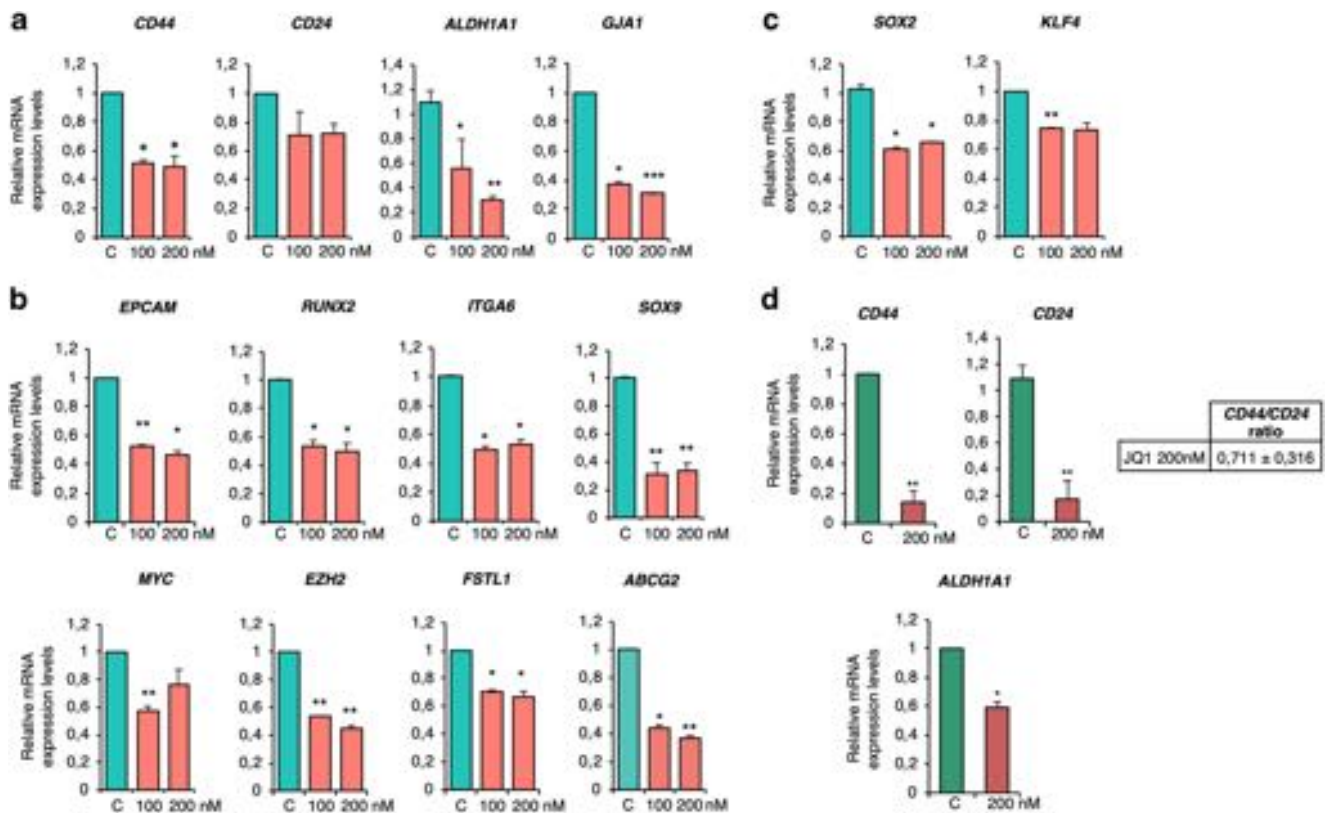
**Fig. 2** BET inhibitor JQ1 impairs crucial stemness-related functions in CSC-mimicking spheroid models. **a**, Relative mRNA expression levels of several CSC markers in the MDA-MB-231 spheroid model (green) compared to those in adherent cultures (light yellow). **b**, Relative mRNA expression levels of *CD44*, *CD24*, *ALDH1A1* and *GJA1* in the BT-549 spheroid model (dark green) compared to those in adherent cultures (orange). **c**, MDA-MB-231 cells were treated with the JQ1 or OTX-015 at the indicated doses for 72 h after which images were taken using an inverted microscope. **d**, Remaining floating spheres from **c** were tested for CD44 surface expression (Red). Stained spheroids were observed by confocal microscopy. Squares display TS nuclear counterstaining with DAPI (blue). **e**, MDA-MB-231 and BT549 spheroids were mechanically dissociated and next exposed to JQ1 (200 nM). Secondary formed spheroids were counted at day 3 and, subsequently, dissociated again to produced tertiary spheroids (day 6). Pictures were taken at both time points using and inverted microscope. **f**, MDA-MB-231 and BT549 spheroids were mechanically dissociated after which serial dilutions were performed to cover a range from 1 to 200 cells per well (in triplicates).

LDA in the absence and presence of JQ1 (200 nM) was performed to evaluate the self-renewal capacity of the spheroid models. The ability to form tumour spheres in both conditions was evaluated at day 21 and formed spheroids were counted. **g**, Freshly dissociated MDA-MB-231 or BT549 spheroids (10,000 cells/well in 48-well plates) were gently layered on a thin matrigel matrix. 24 h later, matrigel-embedded cells were left untreated or exposed to JQ1 (200 nM). 48 h later, pictures of the invasion structures were taken, and 3D structure areas and the number of ramifications of each condition were evaluated. **h**, MDA-MB-231 spheroids were incubated with JQ1 at the indicated doses. After 24 h, cell cycle progression was examined by flow cytometry. DNA staining was performed using propidium iodide. The histogram shows the percentage of cells in the different phases of the cell cycle. **i**, MDA-MB-231 spheroids were exposed to the indicated doses of JQ1. After 72 h, apoptotic activity was assessed by flow cytometry for Annexin V binding evaluation. The histogram shows the percentage of viable cells (Annexin V-). All results shown represent the average of 3 independent experiments. Student t-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$

CSC markers, elevated *CD44/CD24* ratios, self-renewal capabilities and high invasion potentials, we found that JQ1 can jeopardize stemness in TNBC.

First, our transcriptomic analysis and qRT-PCR results in 2D, 3D and in vivo models, revealed several JQ1-associated stemness-related genes in TNBC, including *CD44*, *CD24* and





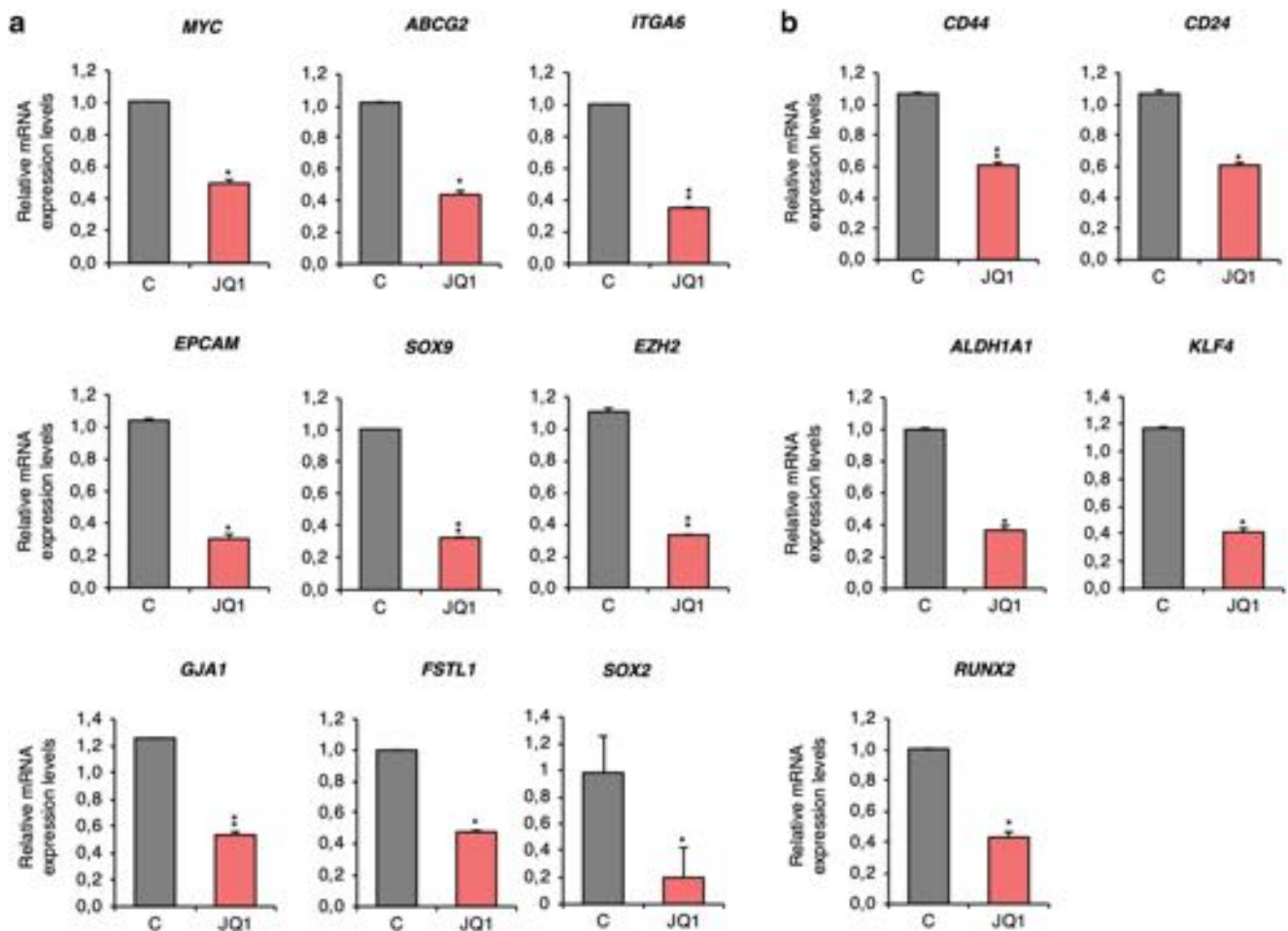
**Fig. 3** JQ1 efficiently decreases the expression of CSC markers in MDA-MB-231 (a) and BT549 (b) spheroids. c. Effect of JQ1 on the classical stemness markers *SOX2* and *KLF4*. d. Relative mRNA levels of *CD44*, *CD24* and *ALDH1A1* in spheroids exposed to JQ1 in MDA-MB-231 and

BT549 spheroids, respectively. The results shown represent the average of 3 independent experiments performed in triplicate. Student t-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$

*ALDH1A1*. The *CD44/CD24* ratio, as well as *ALDH1A1* over-expression, are known indicators of tumour aggressiveness, correlating with high proliferation indexes, increased tumour initiation capabilities and augmented invasion and metastasis potentials [21]. We found that JQ1 led to an almost 50% decrease in the *CD44/CD24* ratio and an up to 70% decrease in *ALDH1A1* expression in TNBC cells. We also found that JQ1 negatively affected several transcription factors known to be involved in the initiation and maintenance of the stemness phenotype in TNBC, such as *MYC*, *EZH2*, *SOX9* and *RUNX2* [35–37]. *MYC*, *EZH2* and *SOX9* are known to be repressed in response to BET inhibition in several malignancies, such as medulloblastoma, bladder cancer and myelofibrosis [14, 38–40], but as yet the effect of JQ1 on these genes in TNBC has not been explored. Moreover, we found that *RUNX2*, a stemness marker highly expressed in TNBC [41] and known to play a crucial role in breast cancer metastasis [42], can be negatively targeted by BETi in TNBC. This result, which is supported by previous data [43], could open the way to the development of *RUNX2*-targeting therapies. On the other hand, JQ1 may deregulate stemness genes that code for proteins involved in several other functions, such as *EPCAM*, *ABCG2*, *ITGA6*, *GJA1*, *FSTL1* and *PIAS3*.

These proteins have been linked to cancer progression, resistance to chemo- and radiotherapy, poor prognosis and/or metastasis [4, 44–51]. Therefore, targeting these proteins with JQ1 could be of clinical interest in TNBC.

Two-dimensional cell culture models of cancer have progressively lost support over the last few years in favour of 3D models, which better reflect the in situ behaviour of cancer cells [22]. Several tools have been used to develop in vitro 3D cultures that mimic stemness features and are capable of predicting toxicity and resistance to anti-tumour compounds. Here, we used a MDA-MB-231-derived spheroid model to recapitulate TNBC and demonstrate that JQ1 not only modulates stemness-related genes in this 3D model, but also represses tumour self-renewal and invasion potentials, which are crucial stemness characteristics. JQ1 treatment did not lead to apoptosis in this population, but instead induced an increase in the G0/G1 population, indicative of cell cycle arrest in this phase. More importantly, we found that his BETi directly impacted tumour sphere formation, a key stemness feature, as indicated by secondary and tertiary sphere formation and limiting dilution assays. This result points to a direct role of JQ1 as a tumour stemness regulator.



**Fig. 4** JQ1 effects the expression of CSC markers in an in vivo pre-clinical model. **a.** *MYC*, *ABCG2*, *ITGA6*, *EPCAM*, *SOX9*, *EZH2*, *GJA1*, *FSTL1* and *SOX2* mRNA levels in JQ1-treated tumours compared to vehicle-treated tumours. **b.** *CD44*, *CD24*, *ALDH1A1*, *KLF4* and

*RUNX2* mRNA level changes observed upon JQ1 exposure. The qRT-PCR conditions are described in material and methods. Student t-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  and \*\*\*  $p < 0,001$

As mentioned above, targeting tumour stemness may be a good strategy to revert chemotherapy resistance and cancer recurrence. In this sense, some of the stemness-related genes identified in this study were able to predict relapse and a lack of response to chemotherapy in breast cancer patients. Among them, *GJA1*, *CD24*, *EPCAM* and *SOX9* were found to be associated with a worse patient prognosis. Interestingly, we also found that combined expression of these four genes had a higher predictive potential than each gene individually. This may have clinical implications, as this 4-genes subpanel may potentially serve as a TNBC prognostic biomarker set.

On the other hand, using an online transcriptome-level validation tool for predictive biomarkers [52], we found that *ABCG2*, associated with resistance to chemo- and radiotherapy [53] and *RUNX2*, which has been shown to chemosensitize breast cancer cells to neoadjuvant therapy [43], are more highly expressed in non-responder patients. Although not all the parameters analysed reached statistical significance, the observed trends could be corroborated using other probes

available in the tool (data not shown). The association of *ABCG2* with resistance to therapy has been extensively confirmed [54]. Our results also confirm a role for *RUNX2* as a potential predictive marker for chemotherapy response in TNBC. Although no significant association with either patient outcome or response to treatment was found for the rest of the genes contained in the stemness-related panel, evaluation of the expression levels of the whole stemness-panel, including all the 13 identified genes, might be of interest for the choice of treatment in patients with aggressive tumours.

Although BETi exhibit marked antitumor activities in TNBC, single treatment seems to have limited value for clinical cancer management. Conversely, combination therapy is gaining ground [55]. BETi have, for example, successfully been combined with kinase inhibitors [13, 56] and histone deacetylase inhibitors [57] in breast cancer, but its combination with chemotherapeutic agents has not been explored yet. Our data support the use of JQ1 in combination with other anticancer drugs to overcome therapy resistance.



## 5 Conclusions

In summary, in this work we describe a novel function for the BETi JQ1 in TNBC as a stemness-targeting drug. We identified a 13-genes stemness signature which can be deregulated by JQ1 and may have potential as a biomarker for chemotherapy treatment response and patient prognosis in TNBC. Given the high level of interaction of the predicted gene signature network, and given the fact that the identification of biomarker-interacting maps and the discovery of drug targets are main goals of future medicine [58], JQ1 may be considered as a stemness interactome-based drug (Fig. 6). Altogether, our results support the idea that targeting the epigenome with JQ1, through its impact on stemness-related genes and features, may help to overcome TNBC resistance to standard therapy. This may have potential therapeutic implications with respect to the choice of anti-tumour agents for each patient, allowing more individualized TNBC treatment.

**Acknowledgements** We would like to thank the cancer associations AMUMA and ACEPAIN and their members for their support. We also thank Dr. Julie Dwyer for her help with editing the manuscript. In addition, we would like to acknowledge all members of the Translational Oncology group. In particular, we thank Fernando Andres-Pretel for this technical assistance.

**Author contributions** EMGM conceived the study and performed the original design of the experiments. LSO, MNC, SMG, CNJ, VSC, JPP and MB performed the experiments. SMG, BG, and MNC searched the data and performed the analysis. MNC, SMG, CNJ and EMGM prepared the figs. BG, AO and EMGM discussed the data. AO and EMGM drafted the manuscript. EMGM wrote the manuscript. All authors reviewed, included modifications and approved the final version of the manuscript.

**Funding information** Diputación de Albacete, AMUMA, and Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (SBPLY/19/180501/000173) (to EMGM). Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121 and PI19/00808), ACEPAIN, Diputación de Albacete and CRIS Cancer Foundation (to AO). E.M.G.M. was funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds). SMG was funded by a fellowship from the Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB). MB was supported by a Castilla-La Mancha Government regional grant for Biomedicine and Health Science Research ref.: II-2018\_11. BG was supported by NVKP\_16-1-2016-0037 and FIEK\_16-1-2016-0005 grants of the National Research, Development and Innovation Office, Hungary.

**Data Availability** All data generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethics statement** All animal studies were carried out according to protocols approved by the ethics committee on animal experimentation of Castilla-

La Mancha University, in accordance with the requirements of the Institutional Guideline for Animal Experiments (Procedure PR-2017-03-07).

**Consent for publication** Not applicable.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011)
2. L.L. Campbell, K. Polyak, Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332–2338 (2007)
3. J. Kim, S.H. Orkin, Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: Insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med* **3**, 75 (2011)
4. M. Dean, T. Fojo, S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* **5**, 275–284 (2005)
5. S. Colak, J.P. Medema, Cancer stem cells - important players in tumor therapy resistance. *FEBS J* **281**, 4779–4791 (2014)
6. T. Borovski, E. De Sousa, F. Melo, L. Vermeulen, J.P. Medema, Cancer stem cell niche: The place to be. *Cancer Res* **71**, 634–639 (2011)
7. J. Monteiro, R. Fodde, Cancer stemness and metastasis: Therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer* **46**, 1198–1203 (2010)
8. T.M. Malta, A. Sokolov, A.J. Gentles, T. Burzykowski, L. Poisson, J.N. Weinstein, B. Kamińska, J. Huelsken, L. Omberg, O. Gevaert, A. Colaprico, P. Czerwińska, S. Mazurek, L. Mishra, H. Heyn, A. Krasnitz, A.K. Godwin, A.J. Lazar, Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. *Cell* **173**, 338–354.e15 (2018)
9. M.A. Dawson, T. Kouzarides, Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012)
10. E.N. Wainwright, P. Scaffidi, Epigenetics and Cancer stem cells: Unleashing, hijacking, and restricting cellular plasticity. *Trends Cancer* **3**, 372–386 (2017)
11. N. Ahuja, A.R. Sharma, S.B. Baylin, Epigenetic therapeutics: A new weapon in the war against Cancer. *Annu Rev Med* **67**, 73–89 (2016)
12. S. Genta, M.C. Piroso, A. Stathis, BET and EZH2 inhibitors: Novel approaches for targeting Cancer. *Curr Oncol Rep* **21**, 13 (2019)
13. C. Nieto-Jiménez, A. Alcaraz-Sanabria, J. Pérez-Peña, V. Corrales-Sánchez, G. Serrano-Heras, E.M. Galán-Moya, L. Serrano-Oviedo, J.C. Montero, M. Burgos, J. Llopis, A., Ocaña A. Pandiella, Targeting basal-like breast tumors with bromodomain and extraterminal domain (BET) and polo-like kinase inhibitors. *Oncotarget* **8**, 19478–19490 (2017)
14. V. Sahai, A.J. Redig, K.A. Collier, F.D. Eckerdt, H.G. Munshi, Targeting BET bromodomain proteins in solid tumors. *Oncotarget* **7**, 3997–54009 (2016)



15. T. Braun, C. Gardin, Investigational BET bromodomain protein inhibitors in early stage clinical trials for acute myelogenous leukemia (AML). *Expert Opin Investig Drugs* **26**, 803–811 (2017)
16. R.D. Chacón, M.V. Costanzo, Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**(Suppl 2), S3 (2010)
17. J.C. Montero, A. Esparís-Ogando, M.F. Re-Louhau, S. Seoane, M. Abad, R. Calero, A. Ocaña, A. Pandiella, Active kinase profiling, genetic and pharmacological data define mTOR as an important common target in triple-negative breast cancer. *Oncogene* **33**, 148–156 (2014)
18. A. Ocana, A. Pandiella, Targeting oncogenic vulnerabilities in triple negative breast cancer: biological bases and ongoing clinical studies. *Oncotarget* **8**, 22218–22234 (2017)
19. M.H. Manjili, Tumor dormancy and relapse: From a natural byproduct of evolution to a disease state. *Cancer Res* **77**, 2564–2569 (2017)
20. G. Bianchini, J.M. Balko, I.A. Mayer, M.E. Sanders, L. Gianni, Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 674 (2016)
21. W. Li, H. Ma, J. Zhang, L. Zhu, C. Wang, Y. Yang, Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep* **7**, 13856 (2017)
22. E.-T. Verjans, J. Doijen, W. Luyten, B. Landuyt, L. Schoofs, Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J Cell Physiol* **233**, 2993–3003 (2018)
23. Z. Mihály, M. Kormos, A. Lánckzy, M. Dank, J. Budczies, M.A. Szász, B. Gyórfy, A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **140**, 219–232 (2013)
24. M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48–58 (2002)
25. J.P. Pinto, R.K. Kalathur, D.V. Oliveira, T. Barata, R.S.R. Machado, S. Machado, I. Pacheco-Leyva, I. Duarte, M.E. Futschik, StemChecker: A web-based tool to discover and explore stemness signatures in gene sets. *Nucleic Acids Res* **43**, W72–W77 (2015)
26. J. Zuber, J. Shi, E. Wang, A.R. Rappaport, H. Herrmann, E.A. Sison, D. Magoon, J. Qi, K. Blatt, M. Wunderlich, M.J. Taylor, C. Johns, A. Chicas, J.C. Mulloy, S.C. Kogan, P. Brown, P. Valent, J.E. Bradner, S.W. Lowe, C.R. Vakoc, RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* **478**, 524–528 (2011)
27. Y. Wu, Y. Wang, P. Diao, W. Zhang, J. Li, H. Ge, Y. Song, Z. Li, D. Wang, L. Liu, H. Jiang, J. Cheng, Therapeutic targeting of BRD4 in head neck squamous cell carcinoma. *Theranostics* **9**, 1777–1793 (2019)
28. S. Venataraman, I. Alimova, P. Harris, D.K. Birks, I. Balakrishnan, M. Remke, M.D. Taylor, M. Handler, N.K. Foreman, R. Vibhakkar, Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma. *Oncotarget* **5**, 2355–2371 (2014)
29. S. Shu, C.Y. Lin, H.H. He, R.M. Witwicki, D.P. Tabassum, J.M. Roberts, M. Janiszewska, S.J. Huh, Y. Liang, J. Ryan, E. Doherty, H. Mohammed, H. Guo, D.G. Stover, M.B. Ekram, J. Brown, C. D'Santos, I.E. Krop, D. Dillon, M. McKeown, C. Ott, J. Qi, M. Ni, P.K. Rao, M. Duarte, S.Y. Wu, C.M. Chiang, L. Anders, R.A. Young, E. Winer, A. Letai, W.T. Barry, J.S. Carroll, H. Long, M. Brown, X.S. Liu, C.A. Meyer, J.E. Bradner, K. Polyak, Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature* **529**, 413–417 (2016)
30. J.M. Sahni, S.S. Gayle, K.L.W. Bonk, L.C. Vite, J.L. Yori, B. Webb, E.K. Ramos, D.D. Seachrist, M.D. Landis, J.C. Chang, J.E. Bradner, R.A. Keri, Bromodomain and Extraterminal protein inhibition blocks growth of triple-negative breast cancers through the suppression of Aurora kinases. *J Biol Chem* **291**, 23756–23768 (2016)
31. J.M. Sahni, S.S. Gayle, B.M. Webb, K.L. Weber-Bonk, D.D. Seachrist, S. Singh, S.T. Sizemore, N.A. Restrepo, G. Bebek, P.C. Scacheri, V. Varadan, M.K. Summers, R.A. Keri, Mitotic vulnerability in triple-negative breast Cancer associated with LIN9 is targetable with BET inhibitors. *Cancer Res* **77**, 5395–5408 (2017)
32. G. Andrieu, A.H. Tran, K.J. Strissel, G.V. Denis, BRD4 regulates breast Cancer dissemination through Jagged1/Notch1 signaling. *Cancer Res* **76**, 6555–6567 (2016)
33. J.S. Zawistowski, S.M. Bevill, D.R. Goulet, T.J. Stuhlmiller, A.S. Beltran, J.F. Olivares-Quintero, D. Singh, N. Sciaky, J.S. Parker, N.U. Rashid, X. Chen, J.S. Duncan, M.C. Whittle, S.P. Angus, S.H. Velarde, B.T. Golitz, X. He, C. Santos, D.B. Darr, K. Gallagher, L.M. Graves, C.M. Perou, L.A. Carey, H.S. Earp, G.L. Johnson, Enhancer remodeling during adaptive bypass to MEK inhibition is attenuated by pharmacologic targeting of the P-TEFb complex. *Cancer Discov* **7**, 302–321 (2017)
34. G.P. Andrieu, G.V. Denis, BET proteins exhibit transcriptional and functional opposition in the epithelial-to-Mesenchymal transition. *Mol Cancer Res* **16**, 580–586 (2018)
35. A.R. Green, M.A. Aleskandarany, D. Agarwal, S. Elsheikh, C.C. Nolan, M. Diez-Rodriguez, R.D. Macmillan, G.R. Ball, C. Caldas, S. Madhusudan, I.O. Ellis, E.A. Rakha, MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br J Cancer* **114**, 917–928 (2016)
36. S. Guo, X. Li, J. Rohr, Y. Wang, S. Ma, P. Chen, Z. Wang, EZH2 overexpression in different immunophenotypes of breast carcinoma and association with clinicopathologic features. *Diagn Pathol* **11**, 41 (2016)
37. M. Nuncia-Cantarero, S. Martinez-Canales, F. Andrés-Pretel, G. Santpere, A. Ocaña, E.M. Galan-Moya, Functional transcriptomic annotation and protein–protein interaction network analysis identify NEK2, BIRC5, and TOP2A as potential targets in obese patients with luminal a breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **168**, 613–623 (2018)
38. G. Sashida, C. Wang, T. Tomioka, M. Oshima, K. Aoyama, A. Kanai, M. Mochizuki-Kashio, H. Harada, K. Shimoda, A. Iwama, The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med* **213**, 1459–1477 (2016)
39. M.A. Voronkova, S. Luanpitpong, L.W. Rojanasaku, V. Castranova, C.Z. Dinu, H. Riedel, Y. Rojanasakul, SOX9 regulates cancer stem-like properties and metastatic potential of single-walled carbon nanotube-exposed cells. *Sci Rep* **7**, 11653 (2017)
40. Y. Wen, J. Cai, Y. Hou, Z. Huang, Z. Wang, Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget* **8**, 37974–37990 (2017)
41. N. Ferrari, L. McDonald, J.S. Morris, E.R. Cameron, K. Blyth, RUNX2 in mammary gland development and breast cancer. *J Cell Physiol* **228**, 1137–1142 (2013)
42. X.-Q. Li, J.-T. Lu, C.-C. Tan, Q.-S. Wang, Y.-M. Feng, RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin  $\alpha$ 5-mediated colonization. *Cancer Lett* **380**, 78–86 (2016)
43. V. Sancisi, G. Manzotti, M. Gugnoni, T. Rossi, G. Gandolfi, G. Gobbi, et al., RUNX2 expression in thyroid and breast cancer requires the cooperation of three non-redundant enhancers under the control of BRD4 and c-JUN. *Nucleic Acids Res* **45**, 11249–11267 (2017)
44. M. Munz, P.A. Baeuerle, O. Gires, The emerging role of EpCAM in Cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* **69**, 5627–5629 (2009)
45. T. Hiraga, S. Ito, H. Nakamura, EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation: EpCAM expression is associated with bone metastases of breast cancer. *Int J Cancer* **138**, 1698–1708 (2016)

46. T. Hu, R. Zhou, Y. Zhao, G. Wu, Integrin  $\alpha 6$ /Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy. *Sci Rep* **6**, 3376 (2016)
47. B. Mostert, J. Kraan, A.M. Sieuwerts, P. van der Spoel, J. Bolt-de Vries, Prager-van der Smissen WJC, et al. CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Lett* **319**, 49–55 (2012)
48. S.L. Phillips, C.B. Williams, J.N. Zambrano, C.J. Williams, E.S. Yeh, Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (review). *Int J Oncol* **51**, 1005–1013 (2017)
49. M.C.-C. Lau, K.Y. Ng, T.L. Wong, M. Tong, T.K. Lee, X.-Y. Ming, et al., FSTL1 promotes metastasis and Chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma through NF $\kappa$ B–BMP signaling cross-talk. *Cancer Res* **77**, 5886–5899 (2017)
50. J.-J. Qin, L. Yan, J. Zhang, W-D. Zhang, STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 195 (2019)
51. K. Banerjee, H. Resat, Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review: Constitutive STAT3 activation in breast cancer. *Int J Cancer* **138**, 2570–2578 (2016)
52. J.T. Fekete, B. Györfy, ROCplot.org: Validating predictive biomarkers of chemotherapy/hormonal therapy/anti-HER2 therapy using transcriptomic data of 3,104 breast cancer patients. *Int J Cancer* **145**, 3140–3151 (2019)
53. J. Hu, J. Li, X. Yue, J. Wang, J. Liu, L. Sun, D. Kong, Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes. *Oncotarget* **8**, 28463–28470 (2017)
54. Q. Mao, J.D. Unadkat, Role of the breast Cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—An update. *AAPS J* **17**, 65–82 (2015)
55. A. Alqahtani, K. Choucair, M. Ashraf, D.M. Hammouda, A. Alloghbi, T. Khan, N. Senzer, J. Nemunaitis, Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: a review of preclinical and clinical advances in cancer therapy. *Future Sci OA* **5**, FSO372 (2019)
56. E.E. Stratikopoulos, M. Dendy, M. Szabolcs, A.J. Khaykin, C. Lefebvre, M.-M. Zhou, R. Parsons, Kinase and BET inhibitors together clamp inhibition of PI3K signaling and overcome resistance to therapy. *Cancer Cell* **27**, 837–851 (2015)
57. G. Borbely, L.-A. Haldosen, K. Dahlman-Wright, C. Zhao, Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells. *Oncotarget* **6**, 33623–33635 (2015)
58. D.H. Roukos, Disrupting cancer cells' biocircuits with interactome-based drugs: Is 'clinical' innovation realistic? *Expert Rev Proteomics* **9**, 349–353 (2012)

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# Functional transcriptomic annotation and protein–protein interaction network analysis identify NEK2, BIRC5, and TOP2A as potential targets in obese patients with luminal A breast cancer

Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1</sup> · Sandra Martinez-Canales<sup>2</sup> · Fernando Andrés-Pretel<sup>2</sup> · Gabriel Santpere<sup>3</sup> · Alberto Ocaña<sup>2</sup> · Eva Maria Galan-Moya<sup>1</sup>

Received: 18 October 2017 / Accepted: 29 December 2017 / Published online: 12 January 2018  
© The Author(s) 2018. This article is an open access publication

## Abstract

**Purpose** Although obesity is a risk factor for breast cancer, little effort has been made in the identification of druggable molecular alterations in obese–breast cancer patients. Tumors are controlled by their surrounding microenvironment, in which the adipose tissue is a main component. In this work, we intended to describe molecular alterations at a transcriptomic and protein–protein interaction (PPI) level between obese and non-obese patients.

**Methods and results** Gene expression data of 269 primary breast tumors were compared between normal-weight (BMI < 25,  $n = 130$ ) and obese (IMC > 30,  $n = 139$ ) patients. No significant differences were found for the global breast cancer population. However, within the luminal A subtype, upregulation of 81 genes was observed in the obese group ( $FC \geq 1.4$ ). Next, we explored the association of these genes with patient outcome, observing that 39 were linked with detrimental outcome. Their PPI map formed highly compact cluster and functional annotation analyses showed that cell cycle, cell proliferation, cell differentiation, and cellular response to extracellular stimuli were the more altered functions. Combined analyses of genes within the described functions are correlated with poor outcome. PPI network analyses for each function were to search for druggable opportunities. We identified 16 potentially druggable candidates. Among them, NEK2, BIRC5, and TOP2A were also found to be amplified in breast cancer, suggesting that they could act as strategic players in the obese-deregulated transcriptome.

**Conclusion** In summary, our in silico analysis describes molecular alterations of luminal A tumors and proposes a druggable PPI network in obese patients with potential for translation to the clinical practice.

**Keywords** Breast cancer · Transcriptomic analysis · Protein–protein interaction · Clinical outcome · Novel druggable targets · Targeted therapy

## Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer-related death among women worldwide [1]. To this regard, several factors are involved in the initiation and promotion of breast tumors including molecular alterations at the genomic level such as mutations or copy number alterations [2, 3]. Indeed, using functional studies, some of these genomic modifications have been clearly associated with a malignant phenotype, contributing to the oncogenesis of epithelial cells [4, 5]. In addition to these molecular alterations, cancer cells rely on the surrounding microenvironment, where non-transformed cells and stromal components facilitate tumor growth by the secretion of autocrine signals like growth factors [6]. Stimulation of cancer cells by paracrine-secreted factors

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10549-017-4652-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

✉ Eva Maria Galan-Moya  
EvaMaria.Galan@uclm.es

<sup>1</sup> Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla La Mancha (UCLM), C/Almansa 14, 02008 Albacete, Spain

<sup>2</sup> Translational Research Unit, University Hospital, Albacete, Spain

<sup>3</sup> Department of Neuroscience, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA

from interstitial cells including fibroblasts, neutrophils, or endothelial cells can stimulate functions such as proliferation, survival, or migration, which are necessary to the tumor formation and dissemination [7, 8]. However, components of the tumor stroma depend on different conditions and can differ among individuals. Of note, adipose tissue is one of the main components of the breast cancer microenvironment, and therefore, accumulation of fat tissue in the stroma can modify settings of tumor cells and influence their survival [8]. As an example, increased presence of insulin or insulin-like growth factors can affect tumor growth but also response to treatment [9]. In this context, breast tumors that express estrogen receptors are more dependent on stimulating factors [10].

Besides being a risk factor for cancer, obesity has also been associated with detrimental patient outcome, especially in postmenopausal patients [5, 4]. A number of epidemiological studies have demonstrated that how obesity is directly related to cancer mortality. In this sense, an increased body mass index (BMI) has been strongly linked with poor survival in postmenopausal patients carrying estrogen receptor positive tumors [11]. One of the mechanisms proposed to explain how obesity increases breast cancer risk is that adipocyte-secreted hormones could be promoting tumor progression through an increase of cellular proliferation [12]. However, little effort has been put into clarifying how the excess of adipose tissue in the tumor niche influences the molecular characteristics of the residing malignant cells.

In the present article, we aimed to evaluate biological functions that differentiate breast cancer tumors from obese and non-obese patients. To do so, we performed transcriptomic followed by protein–protein interaction network analyses to recognize relevant biological functions with druggable implications.

## Materials and methods

### Transcriptomic and gene expression analyses using bioconductor

We used a public data set (GEO Data Set accession number: GSE 78958) to compare mRNA levels from 405 breast cancer tumors. Affymetrix CEL files were downloaded and analyzed with R 3.3.2 (Bioconductor package). Data from patients not matching our BMI criteria (BMI < 25 or  $\geq$  30) were excluded from the analysis, what reduced tumor samples to 269. Before proceeding with the comparative analysis, we performed a statistical quality control (QC), including relative log expression (RLE) and normalize unscaled standard error (NUSE) graphs. QC validated all samples for the following comparative analysis. Normalization was performed using the robust multi-array (RMA) system, included

in the affymetrix package, and screening with the genefilter package. Data comparison was done using the limma package, comparing array data from each patient group (normal weight: BMI < 25; obese: BMI  $\geq$  30). Once the matrix for the experimental design was established, we used the function `lmFit` to perform a linear adjustment and create the contrast matrix in agreement with the compared groups, necessary to accomplish the Bayesian adjustment to determine the final fold change.

### Analysis of patient characteristics

Comparison of proportions between normal-weight and obese groups we performed for each variable including grade, TNM stage, and patient ethnicity. This comparison was fulfilled using either Pearson's Chi-square or Fisher's exact test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

### Construction and analysis of PPI networks and functional annotation

We used the online tool STRING (<http://www.string-db.org>) to construct interactome maps of deregulated genes (STRING v10 data accessed: 14/02/17 and 10/07/17). Thus, we constructed a PPI map for the underexpressed genes and another for the overexpressed genes. The indicated network properties include:

*Nodes*: number of proteins in the network; *Edges*: number of interactions; *Node degree*: average number of interactions; *Clustering coefficient*: indicates the tendency of the network to form clusters. The closer the local clustering coefficient is to 1, the more likely it is for the network to form clusters; *PPI enrichment p value*: indicates the statistical significance. Proteins are considered hubs when they have more interactions than the average ( $n^\circ$  interactions > node degree).

Functional screening for overexpressed genes was performed using Ensembl database (<http://www.ensembl.org>).

### Evaluation of clinical outcome

The free-access Kaplan–Meier (KM) Plotter Online Tool (<http://kmpplot.com/analysis/>) was used to investigate the relationship between gene expression levels and patient's clinical outcome in luminal A breast cancer. Only overexpressed genes significantly associated with detrimental outcome (Hazard Ratio > 1 and  $p$  value  $\leq$  0.05) were used for subsequent analysis ( $n = 39$ ). This tool was also used to determine relapse free survival (RFS) and overall survival (OS) in combined analyses of all genes included within cell cycle, cell differentiation, cell proliferation, and cellular response to extracellular stimuli functions. All the analyses were performed independently by two authors (MNC and



SMC) and reviewed by a third author (EMGM). No discrepancies were observed.

## Identification of drug candidates

We initially used data from The Drug Gene Interaction Database (DGIdb) <http://dgidb.genome.wustl.edu/> to identify potentially druggable genes and their associated drugs among PPI hub proteins. Next, we used information from GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)), which contains information from several databases, to manually select further druggable target among the PPI hub proteins of each function. Then, as described above, we used the STRING tool to build the druggable obese interactome.

## Molecular alteration identification

We used data contained at cBioportal ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org)), Breast Invasive Carcinoma TCGA,  $n = 816$  [13], to identify potential copy number alterations (amplification or deletion) and the presence of mutations in the druggable genes.

## Results

### Differential gene expression between normal-weight and obese breast cancer patients with luminal A tumors

We performed gene expression analyses in a cohort of 269 breast cancer patients based on their body mass index (BMI). The initial comparison between normal-weight ( $n = 130$ ) and obese ( $n = 139$ ) patients including all breast cancer tumors did not show statistical differences between both groups. Therefore, we decided to perform the analysis in each intrinsic tumor specific subtype (basal-like, HER2, luminal A, and luminal B). While no significant differences were found for the Basal-like, HER2, and luminal B subtypes, we identified 177 deregulated genes in the luminal A subtype (Table 1). Using a fold change of 1.4, we selected 96 and 81 genes that were underexpressed and overexpressed, respectively, in the obese group (Fig. 1 and Table S1). Of note, the analysis of patient characteristics showed no significant differences between groups in relation with clinical stage or tumor grade. However, African American women displayed a significant higher proportion of obese women (Table 2).

Next, we constructed protein–protein interaction (PPI) maps of both identified groups and analyzed the potential functional modules within the networks. Notably, we found a higher number of interactions among proteins in the overexpressed PPI network (node degree: 16.2; clustering coefficient: 0.569) when compared with the underexpressed

**Table 1** Gene expression comparison between normal-weight (B.M.I < 25) and obese (B.M.I  $\geq$  30) breast cancer patients for each molecular subtype

Breast cancer patients (GSE 78958; $n = 269$ )			
Intrinsic subtypes groups	Normal weight (B.M.I < 25)	Obese (B.M.I $\geq$ 30)	Deregulated genes
Basal-like ( $n = 64$ )	$n = 30$	$n = 34$	NS
HER2-enriched ( $n = 27$ )	$n = 15$	$n = 12$	NS
Luminal A ( $n = 145$ )	$n = 68$	$n = 77$	177
Luminal B ( $n = 33$ )	$n = 17$	$n = 16$	NS

(node degree: 1.58; clustering coefficient: 0.398). Indeed, while proteins in the underexpressed map did not exhibit any cohesion, the overexpressed PPI network contained a marked cluster unit (Fig. 1). Functional annotation analyses of the overexpressed genes identified 32 biological functions (Fig. S1 and Table S2).

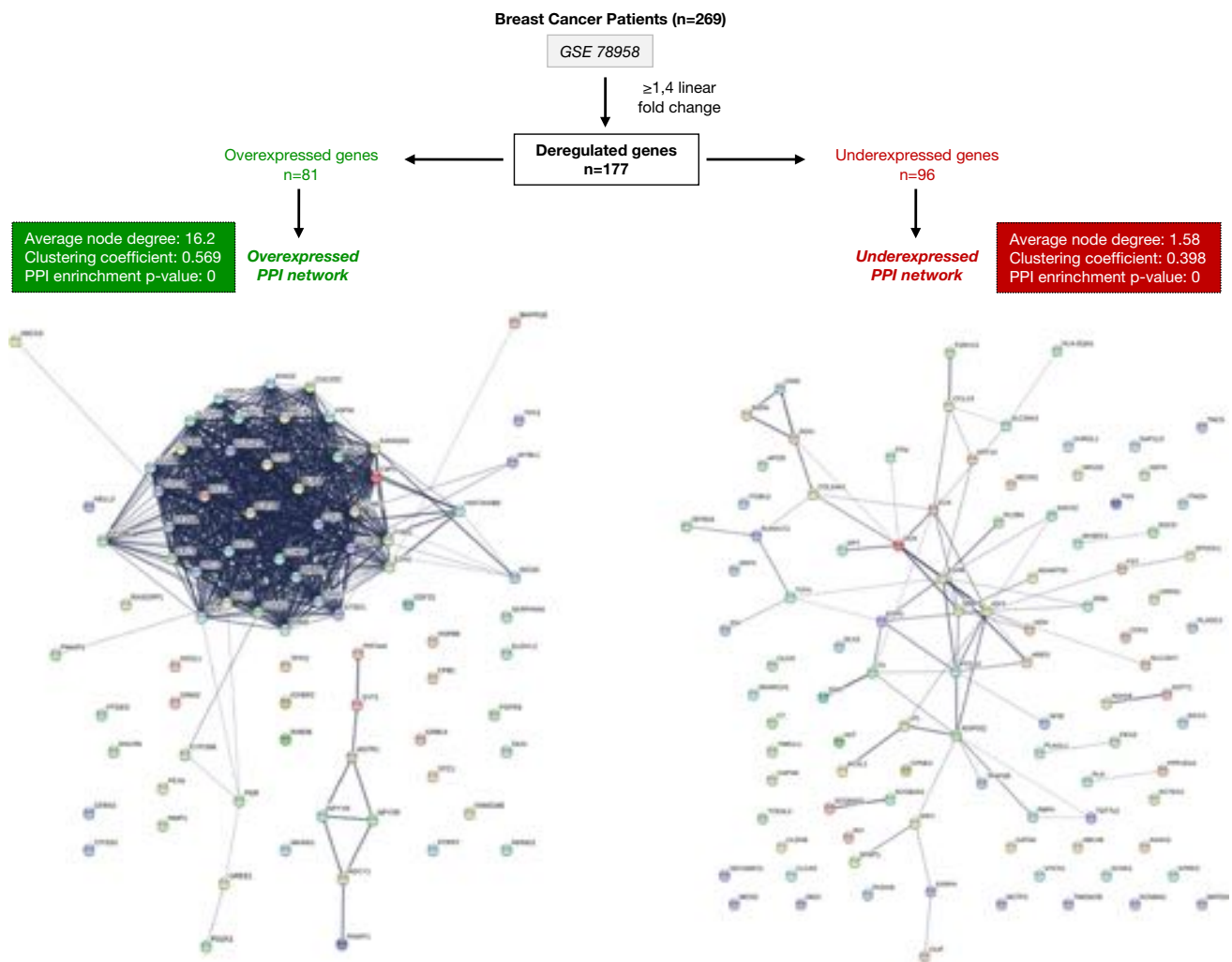
### Identification of upregulated genes associated with worse outcome

Next, we intended to identify the role of the 81 overexpressed genes in relation with patient outcome. We used data contained in the KM plotter online tool [14] that enclose information for more than 5000 breast cancer patients. We identified that 39 genes were significantly associated with detrimental patient outcome, including relapse free survival (RFS), overall survival (OS), or both (Fig. 2a, b), in the subgroup of luminal A breast tumors. To investigate how these genes are interacting among them, we constructed their PPI network. Notably, the PPI map of the proteins codified by the bad prognosis-associated genes formed a highly interconnected cluster (node degree: 30.1; clustering coefficient: 0.901) (Fig. 2a), suggesting that they could act as components of a protein complex with functional links.

### Functional annotation analyses of worse outcome

We performed functional annotation analyses of the genes which predicted unfavorable outcome to identify biological functions that led to a high clustering coefficient [15]. In line with our previous result, many of these genes participated in multiple functions and were, therefore, included in more than one functional group (Table S3). We identified 12 biological functions (Fig. 2c), being cell cycle (33 genes), cell proliferation (19 genes), differentiation (12 genes), and cellular response to extracellular (EC) stimuli (12 genes) the most represented.

The combined analysis of genes contained in each of the functions was associated with detrimental RFS and



**Fig. 1** Gene expression comparison between normal-weight and obese luminal A breast cancer patients. We identify 177 deregulated genes (fold change  $\geq 1.4$ ) in luminal A obese patients. Then,

using the online tool STRING, PPI networks for the underexpressed ( $n = 96$ ) and the overexpressed ( $n = 81$ ) genes were constructed

OS in luminal A (Figs. 3, 4). Cell cycle showed the best correlation with RFS [HR = 2.22 (1.86–2.65), log rank  $p < 1e-07$ ] and a significant association with detrimental OS [HR = 2.71 (1.85–3.97), log rank  $p = 1e-07$ ] (Fig. 3). Cell differentiation gene cluster predicts poor RFS [HR = 1.9 (1.6–2.27), log rank  $p = 3.4e-13$ ] and OS [HR = 2.36 (1.62–3.43), log rank  $p = 4.2e-06$ ] (Fig. 3). Cell proliferation was also associated with lower RFS [HR = 2.12 (1.78–2.53), log rank  $p < 1e-16$ ] and demonstrated the strongest association with poor OS [HR = 2.73 (1.86–4.01), log rank  $p = 9.4e-08$ ] (Fig. 4). Finally, cellular response to EC stimuli gene showed poor RFS [HR = 1.93 (1.62–2.3), log rank  $p = 1e-13$ ] and OS [HR = 2.34 (1.61–3.4), log rank  $p = 4.6e-06$ ] (Fig. 4). We also explored the potential of these functional groups to predict patient outcome in the other molecular subtypes. Of note, combined analysis of these functional genes

groups in Luminal B, HER2 and basal-like subtypes poorly or no significantly correlated with prognosis (Table S4).

### NEK2, BIRC5, and TOP2A are potential therapeutic targets in luminal A obese patients

Protein interactions can be used to prioritize gene candidates in in silico studies and to identify potential druggable targets [16]. PPI networks for these four functions confirmed their functional clustering unity (Fig. S2) and uncovered 18, 10, 6, and 5 hub proteins for cell cycle, cell proliferation, cellular response to extracellular stimuli, and cell differentiation, respectively (Table S5). Of note, BUB1 and CDK1 were the components showing more interactions (edges).

Once we had identified core proteins for each functional cluster, we searched for druggable targets within the networks. Based on their interaction with existing drugs and/or

**Table 2** Proportion comparison of patients' clinical characteristics based on patients BMI

	% (n)		p value
	Normal weight < 25 (n = 68)	Obese ≥ 30 (n = 77)	
<b>Grade</b>			
Well (Grade 1)	50.9% (27)	49.1% (26)	0.182
Moderate (Grade 2)	48.7% (37)	51.3% (39)	
Poor (Grade 3)	25.0% (4)	75% (12)	
<b>TNM Stage</b>			
Stage I	53.0% (35)	47.0% (31)	0.886
Stage II	42.6% (26)	57.4% (35)	
Stage III	37.5% (6)	62.5% (10)	
Stage IV	50.0% (1)	50.0% (1)	
<b>Ethnicity</b>			
African American	30.0% (9)	70.0% (21)	0.008
European American	48.6% (53)	51.4% (56)	
Other	100.0% (6)	0.0% (0)	

the existence of chemical inhibitors, we identified 16 potentially druggable candidates (Supplementary Table 6). We used the identified targetable proteins to construct a druggable PPI map (Fig. 5a). The resulting druggable network has a clustering coefficient tightly close to 1 (0.977), with 12 out of the 16 nodes showing interactions with all the network components (node degree  $\geq 15$ ), what support the idea of a biological functional unit. Thus, the use of compounds against any node within the system might potentially affect the whole network, producing a wider response.

To complete our study, we searched for information about copy number alterations or mutations of the 16 identified druggable genes in the cancer genomics database (cBioportal, [13, 17]). Deletions and mutations were present at a very low frequency. However, NIMA (Never in Mitosis Gene A)-Related Kinase 2 (*NEK2*), Apoptosis Inhibitor Survivin (*BIRC5*) and Topoisomerase (DNA) II Alpha (*TOP2A*) were found to be amplified in breast cancer (12, 6.3, and 5.4%, respectively) (Fig. 5b), suggesting a high potential role for them as therapeutic targets in luminal A patients.

## Discussion

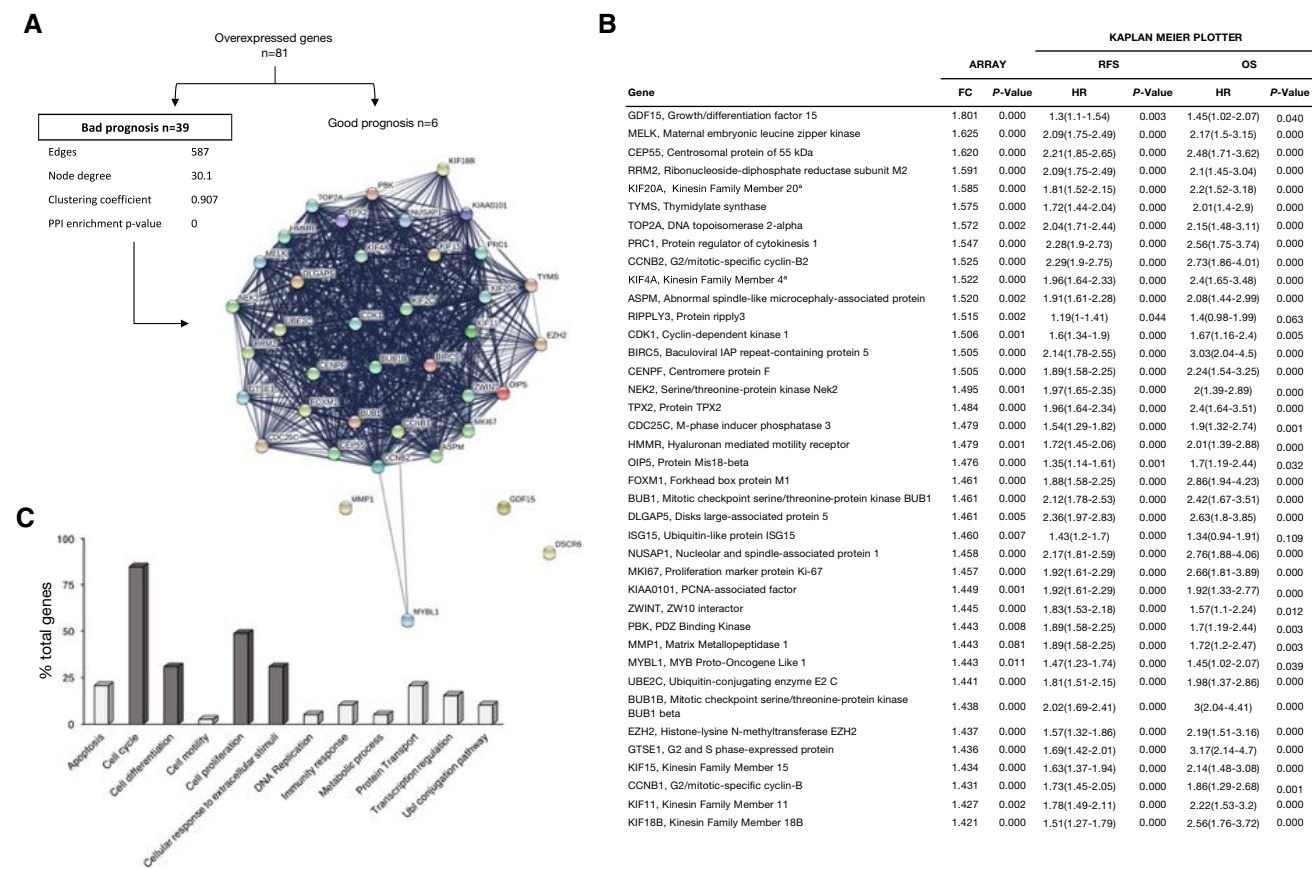
In the present article, we describe biological functions and PPI networks associated with obesity in luminal A tumors, which we found generally associated with worse outcome in luminal A patients. Moreover, we uncover a druggable PPI network on luminal A obese patients which could be of utility to design potential therapeutic strategies.

Although we initially investigated all four subtypes of breast cancer, we only found significant differences between normal-weight and obese patients for the luminal A subtype.

Although this might be due to the fact that luminal A group was the most abundant, the relevant association with outcome and the strong PPI network suggests a relevant biological role. Moreover, the combined analysis of genes within each function was associated with poor outcome in luminal A patients. Of note, the subgroup analysis did not correlate with patient outcome in the other three molecular subtypes (luminal B, HER2, and basal-like). This supports the idea that deregulation of these functions has a specific role in luminal A breast cancers. Our results are in line with those obtained in another study using the same transcriptomic database (GSE 78958) [18], although in this study, PPI analysis and druggable target opportunities were not explored. In addition, our study also identified a signature that is specific for luminal A tumors and explored the relation of this signature with patient outcome.

Although the level of deregulation between obese and non-obese patients was not highly elevated, we found significant differences using a fold changed of 1.4. We are aware that the fold change used is smaller than the one used in other studies [19, 20]. However, this finding could be explained by the fact that obese patients included in our study lack the exact BMI information. It could be expected that the exclusion of the obese-I subtype might have been of utility to increase the difference among our study groups. In any case, even the number of deregulated genes and the level was not high, the upregulation of these transcripts was associated with an important detrimental outcome.

The most frequent functions identified in the overexpressed genes and linked with worse outcome included: cell cycle, cell differentiation, cell proliferation, and cellular response to EC stimuli. Control of cell cycle was the most frequent pathway with genes involved in the formation of the mitotic spindle and centrosome or microtubules formation like *BUB1*, *NUSAP*, *CENPF*, *CEP55*, or the *KIF* family [21]. In addition, other genes were associated with the regulation and control of the cell cycle such as *CDK*, *GTSE1*, *CDC25C*, or *CCNB* [22]. Finally, *FOXM1*, a transcription factor linked with the presence of a Luminal phenotype, was found to be upregulated [23]. Of note, our study also uncovered some interesting downregulated genes in the obese group. Notably, while *EGFR* is overexpressed in around 50% TNBC and inflammatory breast cancers [24], we found that this gene, as well as its ligand *AREG*, was downregulated in the luminal A obese group. Wnt signaling has been implicated in carcinogenesis as well as in obesity promotion [25, 26]. In this line, luminal A obese group also showed a lower expression of Wnt pathway inhibitors, such as *WIF1*, *BICC1*, and the secreted



**Fig. 2** PPI map and functional annotation of bad prognosis-associated upregulated genes in luminal A breast cancer obese patients. **a** Using the K–M plotter tool, we identified overexpressed genes associated with bad prognosis and used them to construct a network of detrimental outcome in luminal A obese patients. **b** List of overexpressed genes associated with bad prognosis. Probe and transcript ID together with the symbol are indicated for each gene. Table includes the infor-

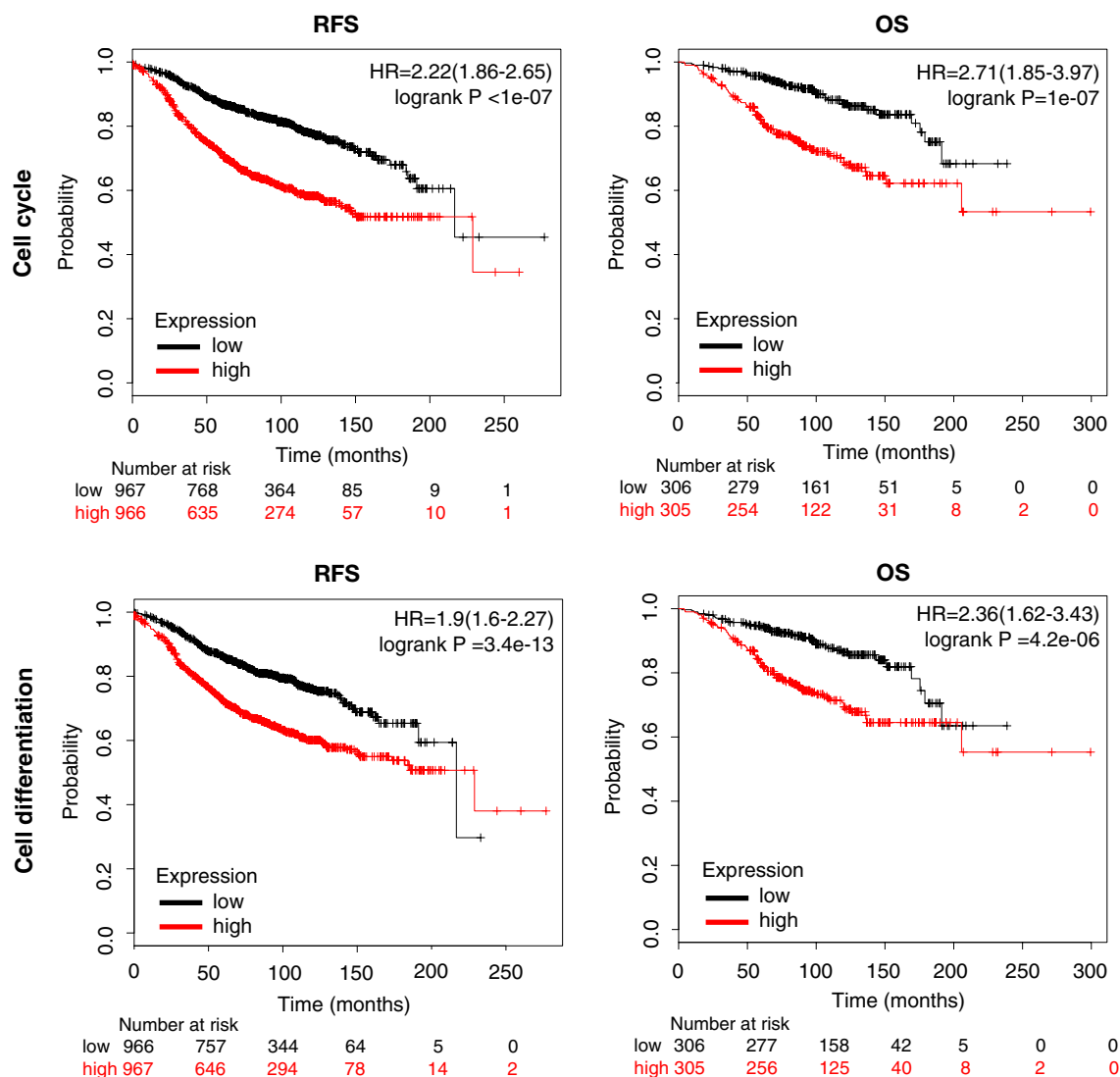
mation for specific fold change difference, Hazard ratio (HR) for relapse free survival (RFS), and overall survival (OS). **c** Functional enrichment analyses of bad-prognosis-associated genes identifies cell cycle, cell differentiation, cell proliferation, and cellular response to extracellular stimuli as the most altered functions in luminal A obese patients

proteins *SFRP1* and *SFRP4*, together with a downregulation of the negative regulators of *MYC*, *TFAP2B*, or *TCF7L* [27, 28].

Protein–protein interaction (PPI) networks offer information of how different proteins cooperate with others to trigger biological processes within the cell [15, 29]. In this context, we have constructed PPI networks for the deregulated genes in luminal A obese patients. While proteins coded by deregulated genes poorly interact, we have found that exist a solid-clustering unit within the overexpressed PPI network. Remarkably, this dense cluster was comprised by proteins specifically coded by overexpressed genes that were associated with detrimental patient outcome. Thus, interference of one of its components might have an impact on several nodes, which could in turn lead to the destabilization of the network. This could open the window to new therapeutic strategies targeting this overexpressed PPI network in luminal A obese patients.

Next, we decided to search for potential drug targets within the PPI networks, linked with poor prognosis. Using Drug Interaction Database [30], we first identified eight druggable genes: BUB1, TOP2A, BIRC5, KIF11, NEK2, RRM2, TYMS, and PBK. Then, expanding the search to other drug databases, we added eight more druggable candidates: CCNB1, CDK1, FOXM1, KIF4A, KIF20A, MELK, NEK2, and CDC25C. The PPI network built with them exhibited a high degree of interactions and, as indicated by its high clustering coefficient, might act as a cohesive functional unit.

Mitotic-related targets in this druggable network are the aim of new chemical entities with potential for preclinical or clinical translation development [31]. For instance, a well-described target is TOP2A, where doxorubicin-like chemotherapies inhibit their effect [32, 33]. Similarly, strategies to target BUB1 are under preclinical evaluation as this kinase has been described as associated with detrimental prognosis



**Fig. 3** Association with relapse free survival (RFS) and overall survival (OS) of gene sets included in the cell cycle and cell differentiation functions in luminal A breast cancer

in breast and ovarian cancer [20, 34]. Compounds against KIF11 are under development [35] and some in clinical development [36].

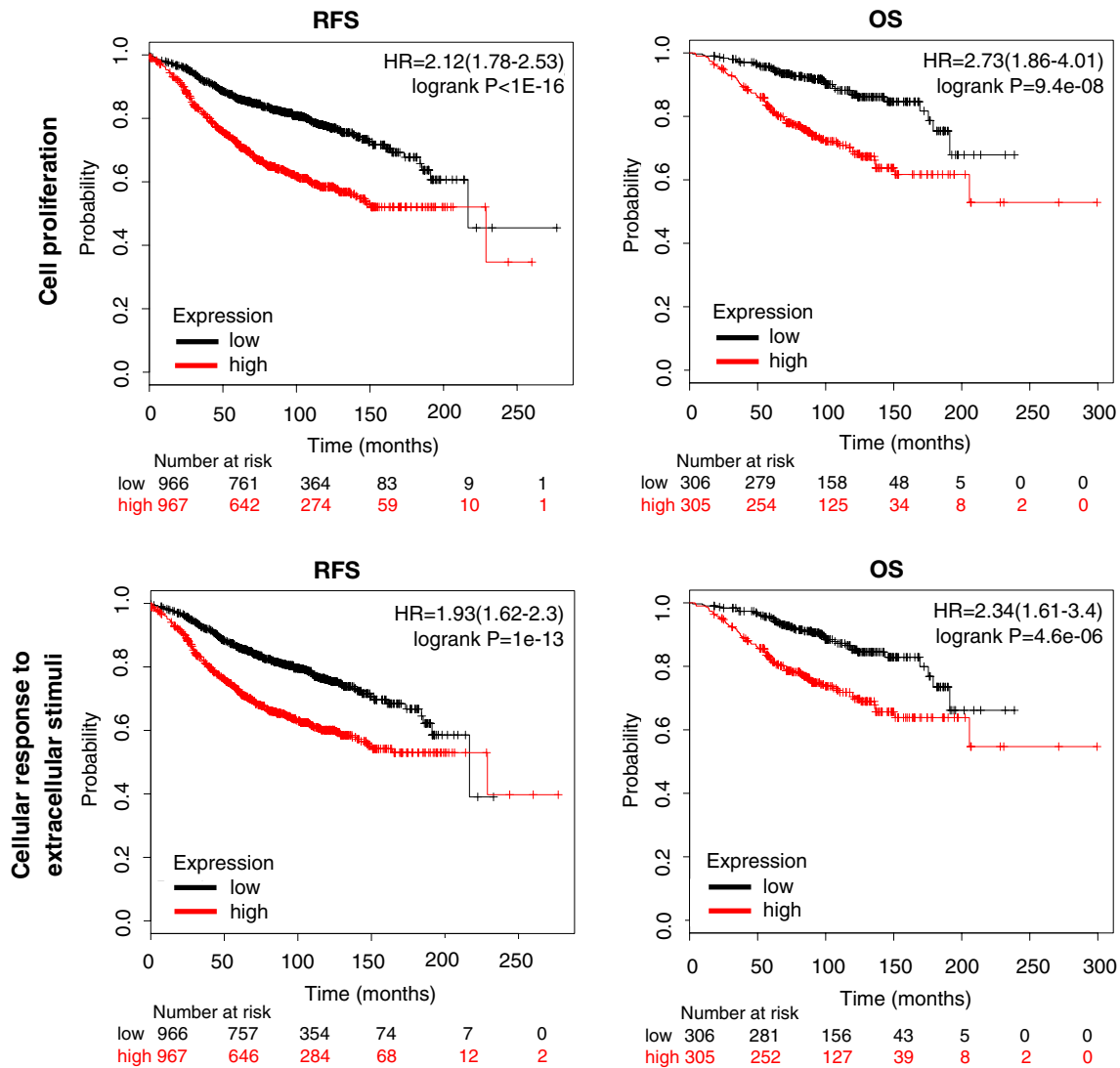
BIRC5 codifies for a protein which is vital for the growth and survival of cancer cells. Survivin is found to be essential for several functions linked with oncogenic transformation [37]. It is known that normal tissues do not express survivin, and high expression in tumors is an indicative of poor prognosis and intrinsic resistance to radio- and chemotherapy [38]. As obese patients express high levels of BIRC5, evaluation of BIRC5 inhibitors, alone or in combination, could be a potential option.

Finally, NEK2 codifies for a serine–threonine kinase with a key role in mitosis that has been found to be aberrantly overexpressed in several cancer types, among them breast cancer [39, 40]. NEK2 expression levels are associated

with tumor progression and detrimental outcome, as well as with drug resistance [41]. Besides, preclinical studies have shown that high NEK2 levels can induce tumorigenesis by mediating chromosome instability and aneuploidy, while its downregulation can lead to cancer cells death [42], suggesting a role for NEK2 as a potential target to treat cancer. Its elevated levels in obese patients points at NEK2 as a good candidate for targeted therapy in these patients. However, although several inhibitors have been developed for NEK2, some of them being highly specific and showing an irreversible inhibition, they have not been taken to clinical evaluation yet [43].

Notably, NEK2 as well as BIRC5 and TOP2A were amplified in more than 12, 6, and 5% of breast cancers, respectively, reinforcing their potential role as key therapeutic targets.

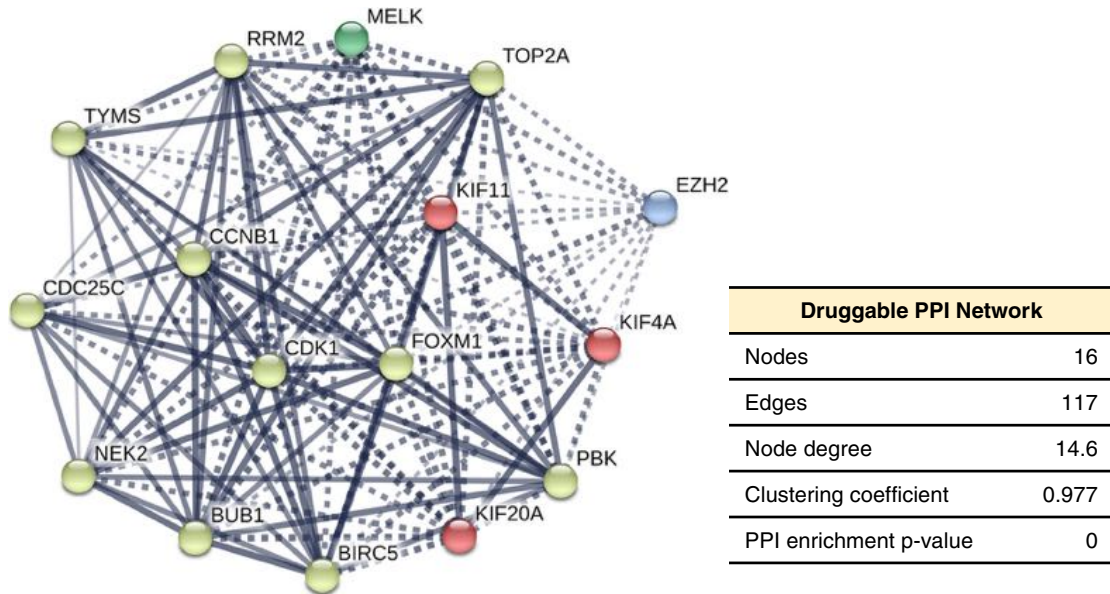




**Fig. 4** Association with relapse free survival (RFS) and overall survival (OS) of gene sets included in the cell proliferation and cellular response to extracellular stimuli functions in luminal A breast cancer

In conclusion, in the present work, we describe functional pathways and protein–protein interacting networks associated with clinical outcome in luminal A tumors from obese patients. Moreover, we identify a druggable interacting map with potential for target inhibition. Although

we acknowledge that this is an *in silico* analyses, and data should be confirmed in samples from patients, our results open new venues for further characterization and have potential for translation into the clinical setting.

**A****B**

	Edges (n)	Breast Invasive Carcinoma (TCGA)		
		Amplification	Deletion	Mutation
<b>BIRC5</b>	<b>15</b>	<b>6,3%</b>	<b>0,1%</b>	-
BUB1	15	0,5%	-	0,4%
CCNB1	15	0,1%	1,3%	0,5%
CDK1	15	2%	0,2%	0,2%
FOXM1	15	2,8%	0,1%	0,5%
KIF11	15	0,1%	0,2%	0,5%
KIF20A	15	0,4%	0,1%	0,5%
KIF4A	15	-	0,5%	1,3%
MELK	15	1,3%	0,1%	0,2%
PBK	15	0,5%	5,4%	0,2%
RRM2	15	1,3%	0,5%	0,4%
<b>TOP2A</b>	<b>15</b>	<b>5,4%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,2%</b>
<b>NEK2</b>	<b>14</b>	<b>12%</b>	-	<b>0,1%</b>
TYMS	14	0,9%	0,1%	0,1%
CDC25C	13	0,4%	0,1%	0,5%
EZH2	13	0,9%	0,1%	0,4%

**Fig. 5** Druggable PPI network in luminal A obese patients. **a** We used the online tool STRING to construct the PPI network of the druggable targets. **b** Percentage of copy number alterations (amplifi-

cations and deletions), and presence of mutation for each druggable gene, obtained from cBioportal data

**Author contribution's** EMGM conceived the project. AO and EMGM designed the study. All authors analyzed and interpreted data. AO and EMGM drafted and wrote the manuscript, and all authors revised it critically and contributed with intellectual content. All authors have approved the final version of this article. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work.

**Acknowledgements** This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), Diputación de Albacete and CRIS Cancer Foundation (to A. Ocaña) and the framework agreement between University of Castilla-La Mancha and Albacete Provincial Council (UCLM-Excma. Diputación de Albacete) in support to research activity (to E.M. Galan-Moya). We would like to also thanks to the cancer associations AMUMA and ACEPAIN for supporting part of this work. E.M. Galan-Moya is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no potential conflict of interest in regard to the present article.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A (2016) Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol Prev Biomark* 25:16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D et al (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463:899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- Howell A, Anderson AS, Clarke RB et al (2014) Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 16:446. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0446-2>
- van Gemert WA, Lanting CI, Goldbohm RA et al (2015) The proportion of postmenopausal breast cancer cases in the Netherlands attributable to lifestyle-related risk factors. *Breast Cancer Res Treat* 152:155–162. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3447-7>
- Crujeiras AB, Cobia B, Carreira MC et al (2016) Secreted factors derived from obese visceral adipose tissue regulate the expression of breast malignant transformation genes. *Int J Obes* 40:514–523. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.208>
- Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K et al (2016) Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res BCR* 18:84. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2>
- Cirri P, Chiarugi P (2012) Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31:195–208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>
- Mao Y, Keller ET, Garfield DH et al (2013) Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 32:303–315. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3>
- Denduluri SK, Idowu O, Wang Z et al (2015) Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis* 2:13–25. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.10.004>
- Strong AL, Strong TA, Rhodes LV et al (2013) Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways. *Breast Cancer Res BCR* 15:R102. <https://doi.org/10.1186/bcr3569>
- Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I et al (2013) The prognostic impact of obesity on molecular subtypes of breast cancer in premenopausal women. *J BUON Off J Balk Union Oncol* 18:335–341
- Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M (2015) Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig* 21:57–74. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0037>
- Ciriello G, Gatza ML, Beck AH et al (2015) Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell* 163:506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
- Mihály Z, Kormos M, Lánckzy A et al (2013) A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 140:219–232. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2622-y>
- Pavlopoulos GA, Secrier M, Moschopoulos CN et al (2011) Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Min* 4:10. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-4-10>
- Athanasios A, Charalampos V, Vasileios T, Ashraf GM (2016) Recent updates on the application of protein-protein interaction network in drug discovery. *Curr Drug Metab*
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U et al (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2:401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Toro AL, Costantino NS, Shriver CD et al (2016) Effect of obesity on molecular characteristics of invasive breast tumors: gene expression analysis in a large cohort of female patients. *BMC Obes* 3:22. <https://doi.org/10.1186/s40608-016-0103-7>
- Pérez-Peña J, Serrano-Heras G, Montero JC et al (2016) In silico analysis guides selection of bet inhibitors for triple-negative breast cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 15:1823–1833. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0004>
- Ocaña A, Pérez-Peña J, Alcaraz-Sanabria A et al (2016) In silico analyses identify gene-sets, associated with clinical outcome in ovarian cancer: role of mitotic kinases. *Oncotarget* 7:22865–22872. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8118>
- Appierto V, Tiberio P, Cavadini E et al (2009) Antimitotic effect of the retinoid 4-oxo-fenretinide through inhibition of tubulin polymerization: a novel mechanism of retinoid growth-inhibitory activity. *Mol Cancer Ther* 8:3360–3368. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0798>
- Sun X, Zhangyuan G, Shi L et al (2017) Prognostic and clinicopathological significance of cyclin B expression in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96:e6860. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006860>
- Rinaldetti S, Wirtz RM, Worst TS et al (2017) FOXM1 predicts overall and disease specific survival in muscle-invasive urothelial carcinoma and presents a differential expression between bladder cancer subtypes. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17394>
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C et al (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 136:331–345. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9>
- Xiao Q, Chen Z, Jin X et al (2017) The many postures of non-canonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomed*



- Pharmacother Biomed Pharmacother 93:359–369. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.061>
26. Fuster JJ, Zuriaga MA, Ngo DT-M et al (2015) Noncanonical Wnt signaling promotes obesity-induced adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction independent of adipose tissue expansion. *Diabetes* 64:1235–1248. <https://doi.org/10.2337/db14-1164>
  27. Gauger KJ, Bassa LM, Henchey EM et al (2014) The effects of diet induced obesity on breast cancer associated pathways in mice deficient in SFRP1. *Mol Cancer* 13:117. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-117>
  28. Ramakrishnan A-B, Cadigan KM (2017) Wnt target genes and where to find them. *F1000Research* 6:746. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11034.1>
  29. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M et al (2014) Protein–protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 7:17–31
  30. Wagner AH, Coffman AC, Ainscough BJ et al (2016) DGIdb 2.0: mining clinically relevant drug–gene interactions. *Nucl Acids Res* 44:D1036–1044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1165>
  31. Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM et al (2015) Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol Cell* 60:524–536. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.006>
  32. Tubbs R, Barlow WE, Budd GT et al (2009) Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27:3881–3886. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.1566>
  33. Bourdakou MM, Athanasiadis EI, Spyrou GM (2016) Discovering gene re-ranking efficiency and conserved gene–gene relationships derived from gene co-expression network analysis on breast cancer data. *Sci Rep* 6:20518. <https://doi.org/10.1038/srep20518>
  34. Ocaña A, Pérez-Peña J, Díez-González L et al (2016) Transcriptional analyses identify association between mitotic kinases, PDZ-binding kinase and BUB1, and clinical outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 156:1–8. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3720-4>
  35. Cross RA, McAinsh A (2014) Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:257–271. <https://doi.org/10.1038/nrm3768>
  36. Rath O, Kozielski F (2012) Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:527–539. <https://doi.org/10.1038/nrc3310>
  37. Groner B, Weiss A (2014) Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 28:27–39. <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0058-x>
  38. Hamy AS, Bieche I, Lehmann-Che J et al (2016) BIRC5 (survivin): a pejorative prognostic marker in stage II/III breast cancer with no response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 159:499–511. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3961-2>
  39. Hayward DG, Clarke RB, Faragher AJ et al (2004) The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer. *Cancer Res* 64:7370–7376. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0960>
  40. Tsunoda N, Kokuryo T, Oda K et al (2009) Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma. *Cancer Sci* 100:111–116. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01007.x>
  41. Zhou W, Yang Y, Xia J et al (2013) NEK2 induces drug Resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers. *Cancer Cell* 23:48–62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.001>
  42. Cappello P, Blaser H, Gorrini C et al (2014) Role of Nek2 on centrosome duplication and aneuploidy in breast cancer cells. *Oncogene* 33:2375–2384. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.183>
  43. Fang Y, Zhang X (2016) Targeting NEK2 as a promising therapeutic approach for cancer treatment. *Cell Cycle* 15:895–907. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1152430>



Article

# Checkpoint Kinase 1 Pharmacological Inhibition Synergizes with DNA-Damaging Agents and Overcomes Platinum Resistance in Basal-Like Breast Cancer

Cristina Nieto-Jimenez <sup>1,2,†</sup>, Ana Alcaraz-Sanabria <sup>1,†</sup>, Sandra Martinez-Canales <sup>1,2</sup> ,  
Veronica Corrales-Sanchez <sup>1</sup>, Juan Carlos Montero <sup>3</sup>, Miguel Burgos <sup>1</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero <sup>2</sup>,  
Atanasio Pandiella <sup>3</sup>, Eva M. Galan-Moya <sup>2,\*</sup> and Alberto Ocaña <sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Translational Research Unit and CIBERONC, Albacete University Hospital, 02002 Albacete, Spain; cnjimenez92@gmail.com (C.N.-J.); analucia\_alcaraz@hotmail.com (A.A.-S.); sanmarca16@gmail.com (S.M.-C.); vero\_nika.s@hotmail.com (V.C.-S.); mburgoslozano@sescam.jccm.es (M.B.)

<sup>2</sup> Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB) and Nursery School, Campus de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, 02008 Albacete, Spain; miriam\_nuncia@hotmail.com

<sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer del CSIC, IBSAL and CIBERONC, 37007 Salamanca, Spain; jcmon@usal.es (J.C.M.); atanasio@usal.es (A.P.)

<sup>4</sup> Hospital Clínico Universitario San Carlos, IDISSC and CIBERONC, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: EvaMaria.Galan@uclm.es (E.M.G.-M.); alberto.ocana@salud.madrid.org or albertoo@sescam.jccm.es (A.O.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 18 November 2020; Accepted: 25 November 2020; Published: 27 November 2020



**Abstract:** Basal-like breast cancer is an incurable disease with limited therapeutic options, mainly due to the frequent development of anti-cancer drug resistance. Therefore, identification of druggable targets to improve current therapies and overcome these resistances is a major goal. Targeting DNA repair mechanisms has reached the clinical setting and several strategies, like the inhibition of the CHK1 kinase, are currently in clinical development. Here, using a panel of basal-like cancer cell lines, we explored the synergistic interactions of CHK1 inhibitors (rabusertib and SAR020106) with approved therapies in breast cancer and evaluated their potential to overcome resistance. We identified a synergistic action of these inhibitors with agents that produce DNA damage, like platinum compounds, gemcitabine, and the PARP inhibitor olaparib. Our results demonstrated that the combination of rabusertib with these chemotherapies also has a synergistic impact on tumor initiation, invasion capabilities, and apoptosis *in vitro*. We also revealed a biochemical effect on DNA damage and caspase-dependent apoptosis pathways through the phosphorylation of H2AX, the degradation of full-length PARP, and the increase of caspases 3 and 8 activity. This agent also demonstrated synergistic activity in a platinum-resistant cell line, inducing an increase in cell death in response to cisplatin only when combined with rabusertib, while no toxic effect was found on non-tumorigenic breast tissue-derived cell lines. Lastly, the combination of CHK1 inhibitor with cisplatin and gemcitabine resulted in more activity than single or double combinations, leading to a higher apoptotic effect. In conclusion, in our study we identify therapeutic options for the clinical development of CHK1 inhibitors, and confirm that the inhibition of this kinase can overcome acquired resistance to cisplatin.

**Keywords:** breast cancer; standard-of-care chemotherapies; chemotherapy resistance; DNA damage response (DDR); CHK1 inhibitors; DNA-damaging agents; platinum compounds; synthetic lethality

## 1. Introduction

The treatment of solid tumors is still based mainly on chemotherapy [1]. However, the recent identification of molecular alterations in tumors has permitted the design and development of therapies against specific oncogenes [1,2]. This has been the case with the identification of HER2 amplification in breast cancer, which led to the design of antibodies or small tyrosine kinase inhibitors against this protein [3,4]. This approach can be clinically beneficial if the molecular alteration is an oncogenic driver and the experimental agent is able to efficiently act on the target. In line with this, other investigational compounds have reached the clinical setting, including B-RAF or MEK inhibitors in BRAF (V600E)-mutant tumors such as melanoma or non-small cell lung cancer [5,6].

Targeted therapies can also be designed against proteins or pathways that can establish a synthetic lethality interaction when combined with other agents [7,8]. The inhibition of a single pathway causes cells to be more dependent on other routes to maintain cell survival; therefore, those survival routes are optimal targets for drug inhibition [8]. As redundancy in biological systems is a common way to maintain cell homeostasis and protect cells from external insults, the inhibition of two complementary pathways can have a substantial impact on cell death [9].

Basal-like breast cancer, which includes the triple negative breast cancer subtype (TNBC), is considered an unsolved medical challenge as patient outcome in the advanced stages is short, even after receiving appropriate treatment [10]. These tumors are characterized by a high grade of genetic instability and a notable impairment of DNA repair processes [1,11]. In this context, DNA-damaging agents like platinum compounds have been positioned as key therapies for the treatment of basal-like tumors. However, although these compounds have shown activity, resistance to these agents appears after a given period of time.

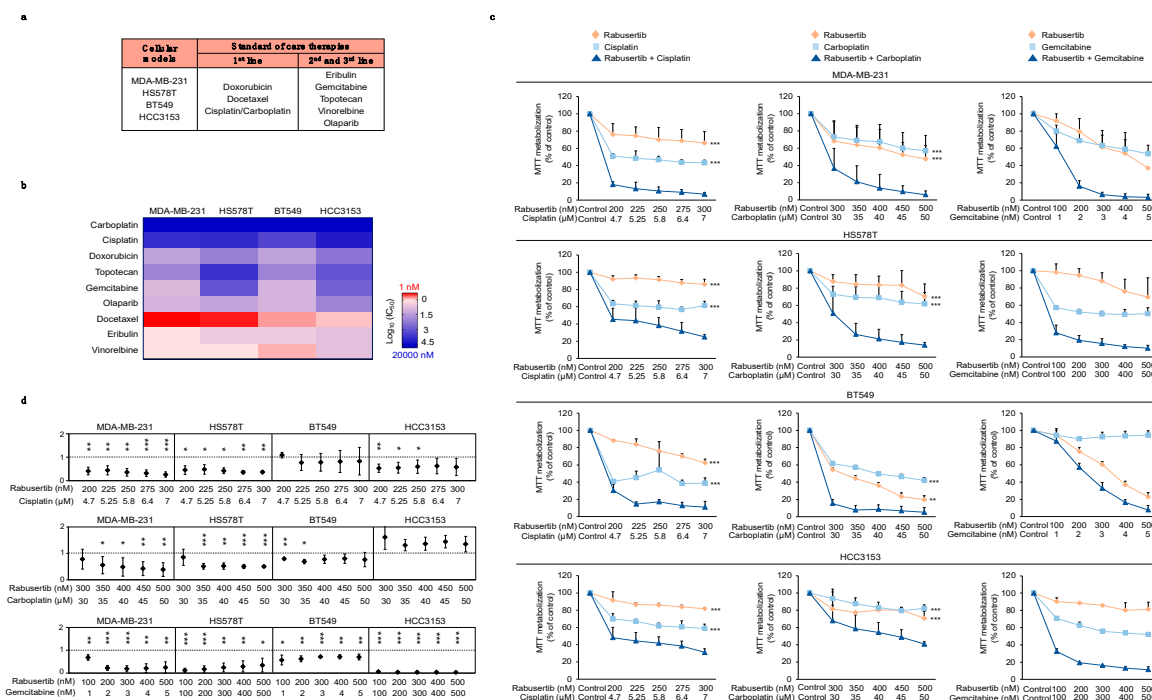
Control of DNA damage is a complex procedure that involves different mechanisms [12]. Multiple players are implicated in the DNA damage response (DDR). The serine/threonine kinase CHK1 is required for checkpoint mediated cell cycle arrest integrating signals from ATM and ATR [13–16]. CHK1 detects cells with DNA damage, and triggers the activation of mechanisms of DNA repair causing cell arrest in G1 [14,15]. Inactivation of CHK1 permits cell cycle progression without a proper DNA repair, therefore increasing genetic instability and aneuploidy, which may finally lead to cell death [14,15]. For this reason, these DDR inhibitors are promising candidates in the treatment of solid tumors. Indeed, CHK1 inhibitors are currently in clinical development, with several phase I studies exploring the safety of these compounds alone or in combination with different chemotherapies [17,18]. Thus, the identification of chemotherapies that could be used as clinical partners to potentiate their effect is a primary goal. Finally, the identification of druggable mechanisms that can overcome resistance to standard-of-care treatments could open avenues to optimize therapeutic strategies in these indications.

Therefore, in this study we evaluated the synthetic lethality interactions between CHK1 inhibitors and different chemotherapeutic agents used in the treatment of patients with basal-like breast cancer. We also evaluated the potential of these compounds to overcome resistance to platinum agents.

## 2. Results

### 2.1. Synergistic Interactions of CHK1 Inhibitors with Standard-of-Care Therapies

To identify the synergistic interactions of standard-of-care therapies with CHK1 inhibitors, we evaluated growth inhibition by measuring MTTs, using currently approved therapies for breast cancer (Figure 1a). We selected agents with different mechanisms of action, including those that inhibit the formation of the mitotic spindle, like vinorelbine, docetaxel, or eribulin, and DNA-damaging agents, such as doxorubicin, platinum compounds (cisplatin and carboplatin), gemcitabine, or topotecan. We also included olaparib, a PARP inhibitor that has recently been approved for the treatment of breast cancers with germ line mutations of the BRCA gene [19]. The IC<sub>50</sub> values of these compounds in four representative cell lines of basal-like breast cancer, MDA-MB-231, HS578T, BT549, and HCC3153 are shown in Figure 1b and Figure S1a. Antimitotic agents displayed the greatest antiproliferative activity.



**Figure 1.** Pharmacological screening of approved therapies in breast cancer. (a) The table shows the chemotherapeutic agents currently used for metastatic breast cancer. The cellular models used in the study are also displayed. (b) Heat map representing color-coded sensibility levels of breast cancer cell lines to chemotherapeutic agents. Cells were seeded and treated with chemotherapeutic agents for 72 h; then, the IC<sub>50</sub> values (logarithmic scale) were defined. (c,d) Synergistic effect of the CHK1 inhibitor (rabusertib) and platinum-derived compounds and gemcitabine in TNBC cells. Cells were treated at the indicated doses for 72 h. Then, metabolization of MTT in viable cells was determined by spectrophotometry and synergistic effects were analyzed using the CalcuSyn program. CI < 1 = synergistic effect; CI = 1 = additive effect; CI > 1 = antagonistic effect. ns > 0.05, *p* < 0.05 \*, *p* < 0.01 \*\*, *p* < 0.001 \*\*\*.

The above standard-of-care drugs were combined with the CHK1 inhibitor rabusertib, an agent that is currently in clinical development. To explore whether the administration of rabusertib was synergistic with any of the chemotherapies mentioned, we used the Chou and Talalay method [20,21]. The IC<sub>50</sub> for this compound in all cell lines is shown in Figure S1b. The combination of platinum agents, both cisplatin and carboplatin, and gemcitabine with the CHK1 inhibitor rabusertib showed a synergistic anti-proliferative effect in most of the cell lines tested (Figure 1c,d). This effect was not observed on the non-transformed epithelial cell line MCF10A and the fibroblasts CRL-2072, derived from normal breast tissue from the mammary gland and the skin, respectively (Figure S2). When rabusertib was combined with the PARP inhibitor olaparib, only MDA-MB-231 and HCC3153 displayed a clear synergistic response (Figure S3).

Doxorubicin, another DNA-damaging agent, showed less activity in the breast models than the previous DNA-targeting compounds, while combinations with topotecan appeared to be highly synergistic for most of the cell lines (Figure S4a).

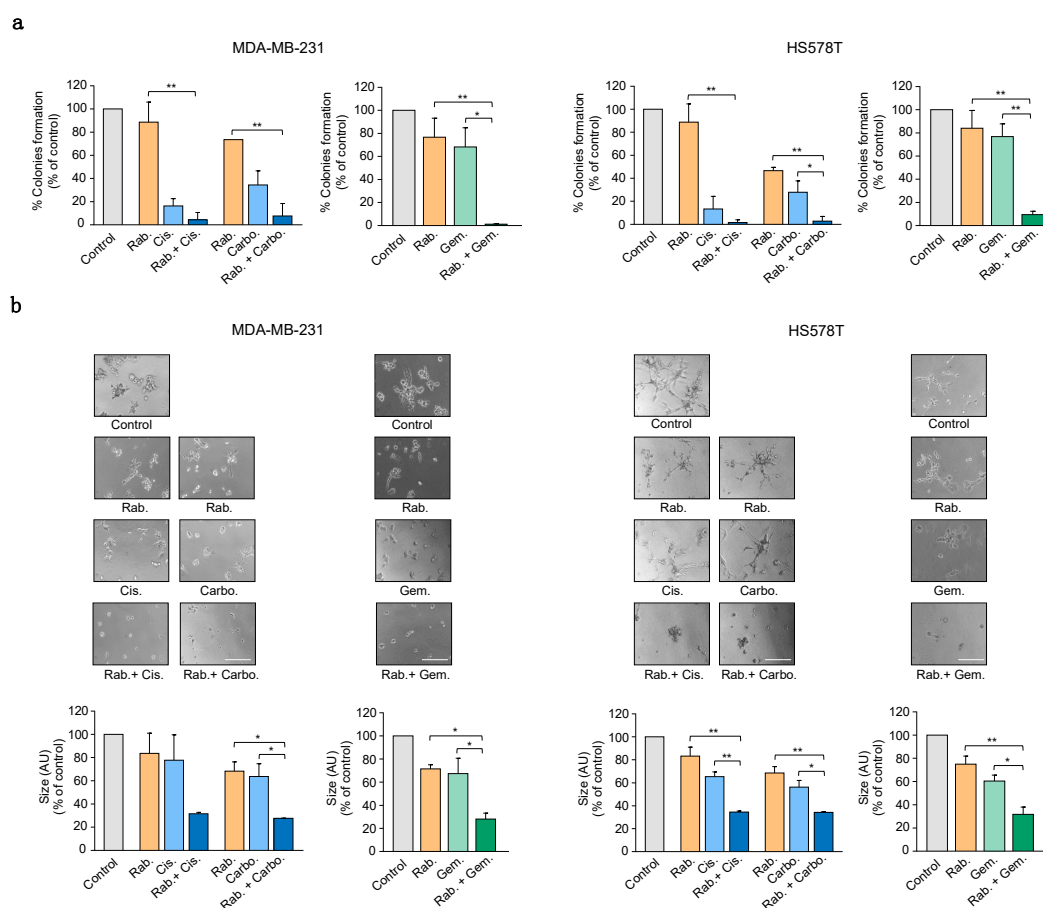
In sharp contrast, the combination of rabusertib with agents that target mitosis, like vinorelbine, docetaxel, and eribulin were not synergistic at any of the evaluated doses (Figure S4b).

Given the high synergistic effect displayed by platinum compounds with rabusertib, we also explored the effect of the combination of these therapies with another CHK1 inhibitor also in clinical development, SAR020106. The synergistic interaction found for both platinum compounds and rabusertib was also confirmed with SAR020106 (Figure S5).

Altogether, these results demonstrate that the inhibition of CHK1 has a strong synergistic interaction with DNA-damaging agents, mainly platinum compounds but also gemcitabine, topotecan, and the novel PARP inhibitor olaparib on basal-like cancer cell lines.

## 2.2. CHK1 Inhibition Reduces Cell Growth in Combination with Platinum Compounds

To evaluate the long-term effect of the most active agents, that is, the platinum compounds cisplatin and carboplatin and gemcitabine, alone or in combination, we performed colony formation assays in the breast cancer cell lines MDA-MB231 and HS578T. As can be seen in Figure 2a, the combination of the platinum agents and gemcitabine with rabusertib had more effect than each agent given alone. Finally, we conducted Matrigel invasion studies to explore the effect of rabusertib with platinum agents and gemcitabine on 3D invading structures growth. Again, the combination displayed more activity than each compound as a single agent for the two cell lines studied (Figure 2b). This set of experiments confirms the effect of the combination of these agents on proliferation, invasion, and long-term survival in basal-like cancer cell lines.

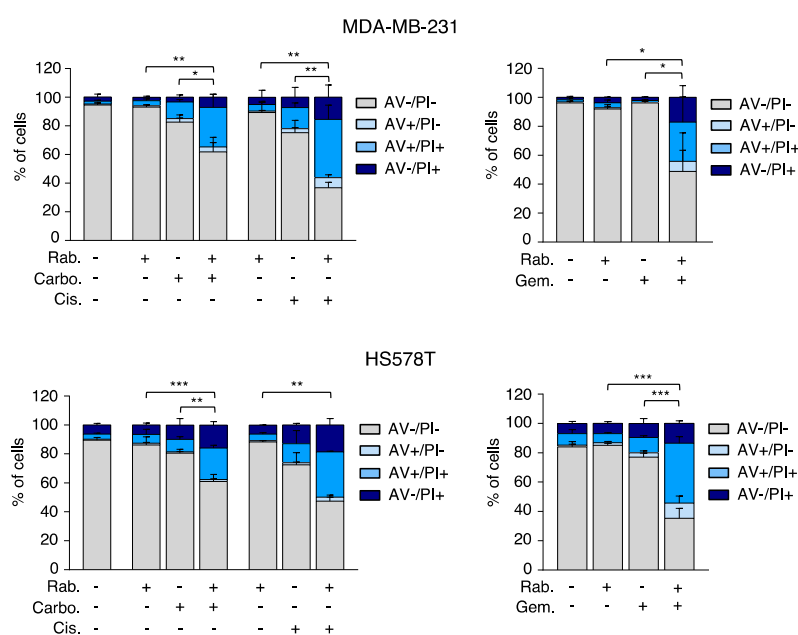


**Figure 2.** The combination of CHK1 inhibitor with platinum derivatives or gemcitabine affects colony formation and invasiveness. **(a)** Colony formation assays in MDA-MB-231 and HS578T. Cells were treated for 24 h with rabusertib (Rab. 300 nM or 350 nM for cisplatin and gemcitabine or carboplatin sample sets, respectively) alone or in combination with cisplatin (Cis. 7  $\mu$ M), carboplatin (Carbo. 35  $\mu$ M), or gemcitabine (3 nM for MDA-MB-231 and 300 nM for HS578T). Percentage of colonies referred to non-treated controls is shown. **(b)** Matrigel invasion assays in TNBC cell lines. Cells were seeded on Matrigel-coated wells, and then treated with the drugs at the same doses as in **(a)** for 48 h. The formation of 3D structures was evaluated by microscopy. Scale bar = 200  $\mu$ M. **(a,b)** Statistics of single against double combination are shown.  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*.

### 2.3. Combination of Platinum Agents and Gemcitabine with Rabusertib Induces Cell Death through a Caspase-Dependent Mechanism

Next, we aimed to explore the effect of the combination of platinum compounds and gemcitabine with rabusertib on the cell cycle. To do so, MDA-MB-231 and HS578T were exposed to each agent alone or combined with rabusertib. Single treatment with rabusertib slightly increased G1 for both cell lines; meanwhile platinum compounds increased G2/M, mainly in MDA-MB-231. Combination of the platinum compounds with rabusertib did not exhibit any obvious effect for either cell line (Figure S6). On the other hand, although exposure to gemcitabine slightly augmented S, combination with the CHK1 inhibitor did not clearly modify the cell cycle pattern (Figure S6).

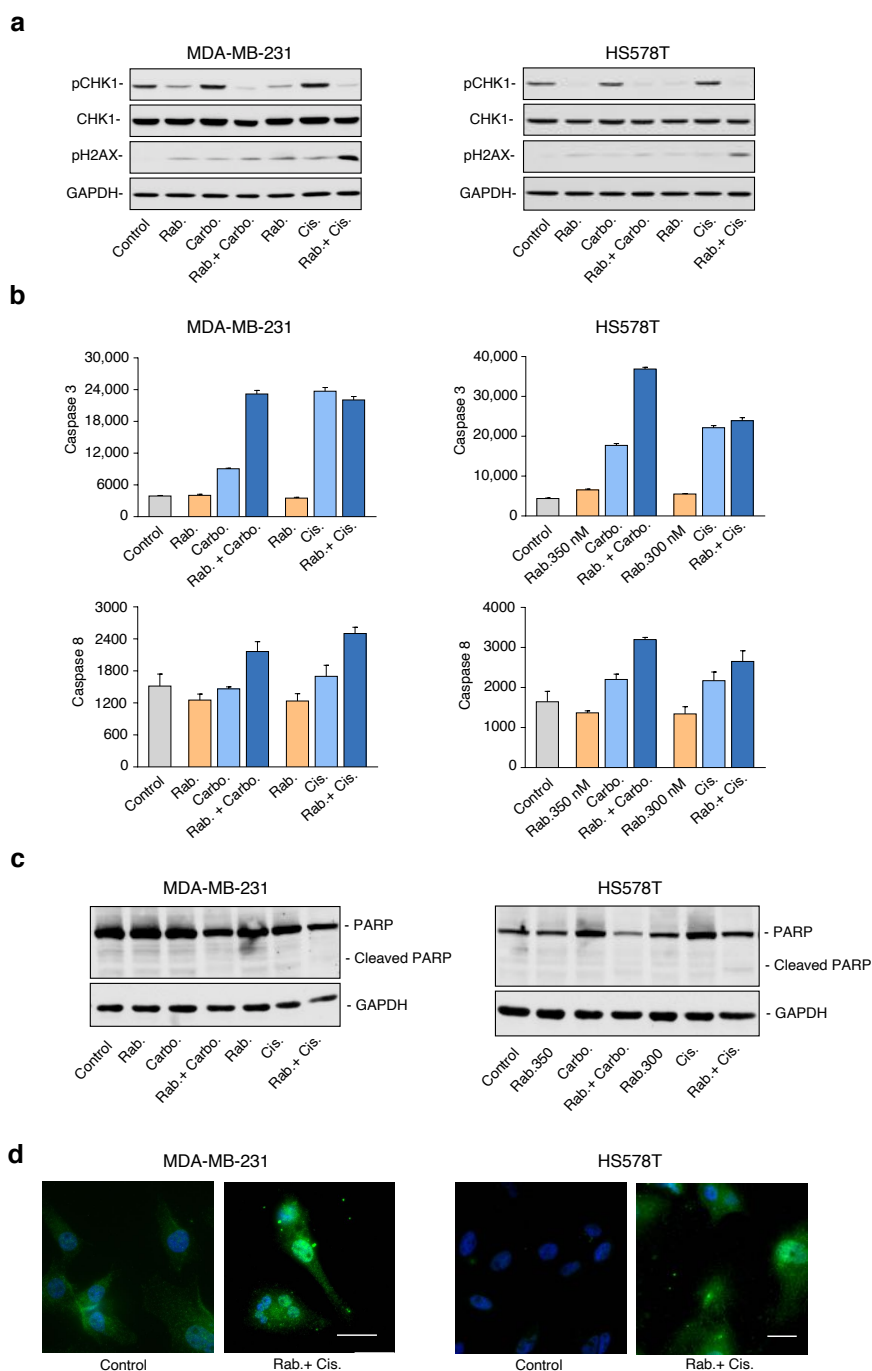
Even though we did not find a clear impact on cell cycle, we hypothesized that genomic instability might be increased with the combination of both agents due to DNA damage, therefore, making the cells enter the apoptotic process. To evaluate the potential induction of cell death, we treated the breast cancer cell lines with the agents alone or in combination with the CHK1 inhibitor, and after 72 h of treatment, exposed them to an Annexin V/PI solution to allow cell death determination by flow cytometry. As can be seen in Figure 3, treatment with the combination intensely increased apoptosis in the two cell lines tested, especially for the combination with gemcitabine, and showed statistical significance for all combinations. Still, the combination of rabusertib with DNA agents did not show a toxic effect on noncancerous breast tissue-derived cells (Figure S7).



**Figure 3.** The combination of rabusertib with carboplatin, cisplatin or gemcitabine promotes cell death. Cells were seeded and then exposed at the same doses of rabusertib, cisplatin, carboplatin and gemcitabine indicated in Figure 2, but for 72 h. Then, the percentage of Annexin V +/- and PI +/- cells was determined by flow cytometry. Statistics for single against double combination are shown.  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

To study the biochemical effect of the treatments, we used Western-blotting to analyze several proteins involved in the activation of DNA damage repair pathways. Rabusertib efficiently inhibited the phosphorylation of CHK1 in both cell lines tested (Figure 4a). In contrast, platinum compounds induced DNA damage, which was measured by the increase in pH2AX, and the subsequent increase in the phosphorylation of CHK1, as a consequence of the activation of the DNA response machinery (Figure 4a). Of note, the combination of both agents increased pH2AX in all cell lines, thus supporting a high genotoxic effect under these conditions (Figure 4a).





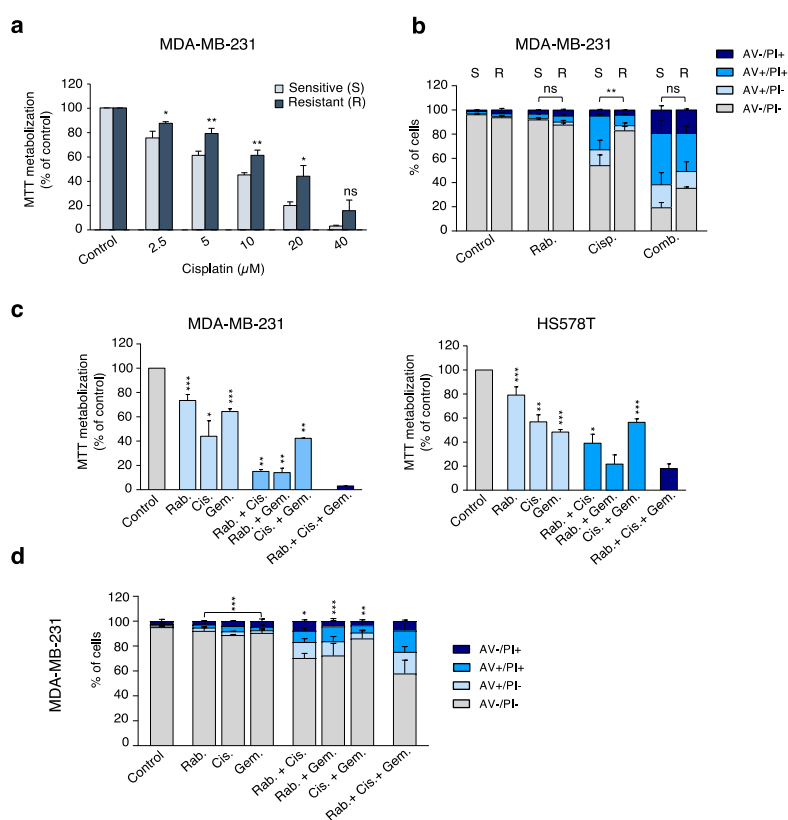
**Figure 4.** The combination of rabusertib with carboplatin and cisplatin increases DNA damage and the activity of caspases implicated in apoptosis. (a–c) Cells were treated as in Figure 3. (a) Then, levels of pCHK1, CHK1, and pH2AX were evaluated by Western blot as described in Section 4. Levels of GAPDH were used as loading control. (b) Cells were lysed, and caspase reaction buffer was added to cell lysates as described in Section 4. Signals were measured in a fluorescent reader (BioTek). (c) After drug exposure, proteins extracts were loaded in a SDS-PAGE and PARP protein bands were visualized. Levels of GAPDH were used as loading control. (d) Fluorescence microscopy was used to obtain images of cleaved caspase 3 immunoreactivity (green) and DNA staining (DAPI, blue). Representative images showing cleaved caspase 3 expression in non-treated cells (control) and rabusertib + cisplatin (combination) in MDA-MB-231 cells (left) and HS578T cells (right) are shown. Scale bar = 50  $\mu$ M.

Next, we explored the mechanisms associated with the induction of apoptosis. A marked increase in Caspase 3 and 8 activities was observed in response to the combinations for both cell lines (Figure 4b). The biochemical evaluation also showed that full-length PARP levels were altered after treatment with the combination, while no clear PARP cleavage was detected (Figure 4c). However, a strong increase in the cleaved form of caspase 3 was observed by immunofluorescence upon exposure to the combination of the drugs (Figure 4d), further supporting the activation of the caspase cascade in response to the combination.

Taken together, this data suggests that inhibition of CHK1 hampers cell cycle arrest in the presence of DNA damage, allowing cells to progress, therefore increasing the genomic instability. Also, these results demonstrate that the induction of apoptosis by the combination of platinum agents with rabusertib was mainly mediated by activation of caspases.

#### 2.4. Inhibition of CHK1 Reverts Resistance to Platinum Compounds

To evaluate the effect of rabusertib on the resistance to platinum compounds, we took advantage of a cisplatin-resistant model generated in our laboratory and derived from the parental cell line MDA-MB-231, MDA-MB231R, as described in material and methods. Resistance to cisplatin was corroborated before the beginning of the experiments (Figure 5a). Both parental and cisplatin-resistant cell lines were then treated with cisplatin, rabusertib, or the combination of both agents. As expected, treatment with cisplatin alone did not have a marked impact on cell death in the resistant model but was very active in the sensitive parental one (Figure 5b). Treatment with CHK1 inhibitor alone did not produce a significant effect in any of the models. Remarkably, addition of rabusertib to cisplatin noticeably increased cell death in both cell lines, including the resistant ones (Figure 5b). These data demonstrate that resistance to cisplatin can be overcome by inhibition of the CHK1 kinase.



**Figure 5.** Rabusertib enhances cell death in cisplatin resistant cells and impacts on cell proliferation when combined with cisplatin and gemcitabine. (a) Resistance to cisplatin was corroborated by MTT



assay where cells were treated at the indicated doses for 72 h. (b) Naïve (S) or cisplatin-resistant (R) MDA-MB-231 cells were treated with rabusertib (Rab. 500 nM) and cisplatin (Cis. 10  $\mu$ M) for 72 h. Then, the percentage of Annexin V +/- and V +/- cells was determined by flow cytometry. Statistics showed differences between S and R. (c,d) TNBC cell lines were treated with CHK1 inhibitor (Rab. 200 nM for MDA-MB-231 and 300 nM for HS578T), cisplatin (Cis. 5  $\mu$ M), gemcitabine (Gem. 2nM for MDA-MB-231 and 200 nM for HS578T), or their combinations for 72 h. (c) Then, metabolization of MTT in viable cells was determined by spectrophotometry or (d) the percentage of Annexin V +/- and PI +/- cells was evaluated by flow cytometry. Statistics of single and double treatments against triple combination are shown. ns > 0.05,  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

### 2.5. CHK1 Inhibition Enhances the Effect of Standard-of-Care Chemotherapies

Clinical development of most new compounds is based on their combination with approved chemotherapies. In this context, we decided to explore the effect of the CHK1 inhibitor rabusertib in combination with the two most active chemotherapies shown in Figure 1b, cisplatin and gemcitabine. As can be seen in Figure 5c, the triple combination had a profound effect compared with single agent or double combinations in basal-like breast cancer cell lines, leading to a higher impact on cell death (Figure 5d).

## 3. Discussion

Selection of synergistic combinations based on synthetic lethality interactions that pose no toxicity issues is crucial in drug development [7,22]. In this context, the identification of agents that regulate DDR and can augment the effect of DNA-damaging agents has important implications in the clinical setting.

In this work, we proposed a combination of agents that are synergistic in basal-like breast cancer, including TNBC, a disease where therapeutic options are limited and there is a clear need to identify new treatments. Of note, this combination includes approved chemotherapies for the treatment of these patients or agents that although not approved are included in clinical guidelines, so their implementation in the clinical setting will not be a limitation.

Basal-like breast cancers commonly carry mutations in genes linked with DNA repair mechanisms like BRCA1, BRCA2, or RAD51. This has led to the development of strategies that act on DNA repair mechanisms, some of which have been quickly translated into the clinical setting, as is the case for the PARP inhibitor olaparib in breast cancer [23,24]. Despite these recent advances, most therapeutic options for this disease are still restricted to combinations of chemotherapies [23].

As we have demonstrated in this article, the combination of DNA-damaging agents such as platinum compounds or gemcitabine, but also topotecan and doxorubicin, with CHK1 inhibitors has a synergistic effect on basal-like breast cancer cells that is not observed when combined with agents targeting mitosis, for example, taxotere, eribulin, or vinorelbine. Moreover, the combination of the platinum compound, cisplatin and the CHK1 inhibitor, rabusertib did not have a toxic effect on non-tumorigenic breast tissue-derived cells, which suggests that the high efficacy of the combination of CHK1 inhibitors and DNA-damaging agents is restricted to cancer cells. A similar antiproliferative effect was observed for PARP inhibitors, reinforcing the concept that inhibition of CHK1 allows cells to enter apoptosis when a relevant genetic instability is present, in this case due to alterations of DNA repair mechanisms or an increase in DNA damage [25]. Therefore, we found that agents that induced DNA damage, like gemcitabine or platinum compounds or to a less extent doxorubicin and topotecan, were synergistic in breast cancer cell lines. This was particularly evident for platinum compounds. Results in line with these findings have been observed in other tumor types such as bladder, pancreatic, or colon cancer [20,22]. However, we recognize that this effect was not observed for some combinations and cell lines, which might be due to the heterogeneity of these cell lines. For instance, the combination of the platinum agent carboplatin and the CHK1 inhibitor in the breast cancer cell line HCC3153. This fact indicates the heterogeneous nature of cancer, which is reiterated,

as recently demonstrated, in cell lines [26]. Importantly, our results show that the CHK1 inhibitor, rabusertib was able to overcome resistance to cisplatin in a resistant model of breast cancer, suggesting its potential use in combination in patients presenting with resistance to platinum agents [27].

In cells that are exposed to DNA damaging-agents, activation of CHK1 induces cell cycle arrest and the initiation of DNA repair mechanisms [14,15]. Inhibition of CHK1 permits cell cycle progression without repairing lesions at a DNA level, increasing genomic instability and finally inducing apoptosis [14,15]. Of note, several CHK1 inhibitors are currently in the early stage of clinical development [13,22].

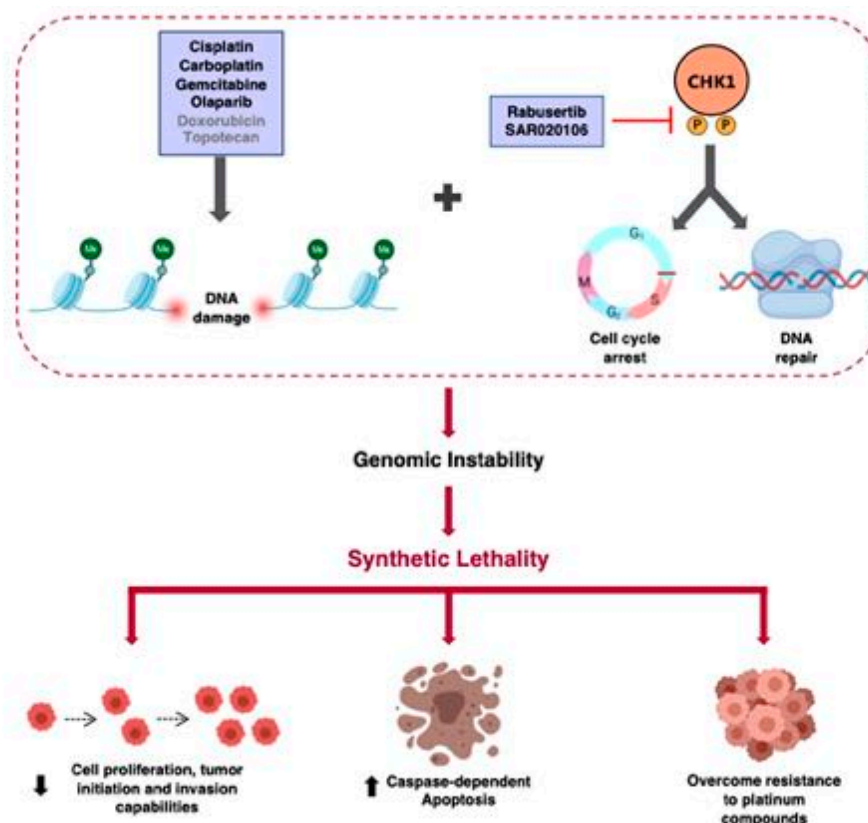
Given the fact that the combination of CHK1 inhibitors with platinum compounds was particularly synergistic, we decided to explore the mechanism of action of this combination, focusing on the biochemical analyses of combinations with cisplatin. The association with cisplatin did not have a clear effect on the pattern of the cell cycle. This finding can be explained as cells can be at different phases of the cell cycle, which limits the observation of any clear action on the cell cycle. This pleiotropic effect has been described on many occasions when agents are administered in combination, and, therefore, it is not surprising [28]. However, this observation does not limit the anti-tumoral effect observed. In line with this, the combination of both agents produced a marked induction of apoptosis. Experiments evaluating caspase cleavage and activity demonstrated that the induction of apoptosis was accompanied by caspase cascade activation.

As expected, administration of platinum compounds induced DNA damage measured by pH2AX, although the effect of each platinum agent can differ between cell lines due to their different mode of action. A similar finding was observed with the CHK1 inhibitor, as it prevents cells from entering the arrest phase, permitting cell cycle progression and, therefore, increasing the genetic instability. The combination of both agents augmented the presence of pH2AX, and demonstrated a clear increase in DNA damage.

We also explored the combination of agents that have a clear translation to the clinical setting, including double combinations with chemotherapies such as cisplatin and gemcitabine. We observed that these triple combinations were more effective than double or single agents given alone. This finding has important implications for the clinical setting, as cisplatin and gemcitabine are standard treatments in non-small cell lung cancer, ovarian cancer and triple negative breast cancer.

Our study has limitations, in particular it is important to recognize that the evaluation of synergistic interactions in cell lines only constitutes an initial step in the development of novel compounds. Only when explored in humans, where other factors such as the immune system or the tumor microenvironment play a role, can the combinational effect be confirmed [29,30]. However, some examples that use in vitro models to evaluate synergism have confirmed their effect later on when evaluated in humans, and therefore these findings were scientifically relevant [31]. In addition, as mentioned, this work has the intrinsic limitation, which is also a strength, of using cell lines that have a wide range of heterogeneity [23].

The data presented here suggests several interesting therapeutic options. On one hand, the finding that DDR inhibitors targeting CHK1 potentiate the action of DNA-damaging agents that are used in the clinical setting provides an important clue for the clinical development of CHK1 inhibitors. Furthermore, the reversal of developed resistance to platinum agents observed when combined with CHK1 inhibitors may have therapeutic relevance for those patients being treated with platinum derivatives (Figure 6).



**Figure 6.** Diagram of the mechanism of action of CHK1 inhibitors in combination with platinum compounds. DNA damage agents induce phosphorylation of CHK1, leading to cell cycle arrest and the activation of the DNA repair machinery. Combination of CHK1 inhibitors with DNA-damaging compounds increases genomic instability, which results in a decrease of cell proliferation and invasion capabilities, eventually unraveling a potent apoptotic response, even in platinum-resistant cells.

## 4. Material and Methods

### 4.1. Cell Lines and Cultures

Breast cancer cell lines were kindly provided by Dr. A. Pandiella. Cell lines were authenticated by STR profiling. They were grown in DMEM (MDA-MB-231, HS578T, and BT549) or RPMI (HCC3153). All media was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine. The non-transformed epithelial cell line MCF10A, derived from a noncancerous mammary gland, was purchased from Elabscience® and maintained in DMEM/F12 supplemented with 5% horse serum, 20 ng/mL EGF, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10 µg/mL insulin, 1% non-essential amino acids plus the abovementioned antibiotics. The main characteristics of all these cell lines are summarized in the following Table 1.

Normal fibroblasts, CRL-2072, derived from breast skin, were kindly provided by the Translational Research Unit of the Ciudad Real University Hospital, Spain, and were grown in DMEM with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cell culture media and supplements were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Cisplatin-resistant breast cancer cells (MDA-MB-231R) were generated by exposure to increasing concentrations of cisplatin (from IC30 to IC70) for 5–6 months (EMGM and MNC).

All cell lines were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Table 1.** Characteristics of breast epithelial cell lines. Information obtained from the ATCC.

Cell Lines	Origin		Receptor Expression				Mutations
	Tissue	Disease	EGFR	ER	PR	HER2	
MDA-MB-231	Mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion	Epithelial adenocarcinoma	Positive	Negative	Negative	Positive (low expression)	BRAF, CD79A, CRTC3, NF2, PCSK7, PDGFRA, TP53
BT549	Mammary gland/breast	Epithelial ductal carcinoma	Positive	Negative	Negative	Negative	PTEN, TP53, RB1
HS578T	Mammary gland/breast	Epithelial carcinoma	Positive	Negative	Negative	Negative	HNF1A, NF1, PIK3R1, TP53
HCC1353	Mammary gland/breast	Ductal carcinoma	Positive	Negative	Negative	Negative	BRCA1
MCF10A	Mammary gland/breast	Fibrocystic disease	Positive	Negative	Negative	Negative	-

#### 4.2. MTT and Synergistic Effect of Rabusertib and Chemotherapeutic Agents

Rabusertib, docetaxel, vinorelbine, gemcitabine, topotecan and olaparib were purchased from Selleckchem (Munich, Germany). Carboplatin and Cisplatin were purchased from Accord Healthcare (Middlesex, UK). Eribulin was from Eisai Inc. (Tokyo, Japan) and doxorubicin from Pfizer GEP, SL (NY, NY, USA).

Dose-response and drug combination studies were performed using MTT screening assays. Thus, cells were seeded into 48-multiwell plates ( $1 \times 10^4$  cells per well), and 24 h later, they were treated either with single agents or a combination of them (IC<sub>50</sub> or lower for the synergy studies). MTT (0.5 mg/mL) was added to the wells 72 h later and then they were incubated for 1 h at 37 °C. Then, the MTT was removed and DMSO was added to solubilize the formed crystals. Last, absorbance values were measured at 555 nm (555–690) in a multiwell plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

Results were plotted as the mean values of three independent experiments. Drugs interactions were calculated by determining combinational index (CI), based on the algorithm reported by Chou and Talalay, using Calcsyn Version 2.0 software (Biosoft, Ferguson, MO, USA). CI < 1 = synergistic effect; CI = 1 = additive effect; CI > 1 = antagonistic effect.

#### 4.3. Clonogenic Assays and Matrigel Embedded 3D Cultures

For clonogenic experiments, cells were seeded in a 60 mm plates ( $5 \times 10^5$  cells per plate) and treated the following day with the indicated doses of the drugs. Twenty-four hours later, cells were trypsinized, counted and resuspended in complete growth medium to perform serial dilutions (1/10). We selected dilutions 3 and 4 to be seeded in triplicate in 6-multiwell plates and maintained for 10 days, when the number of colonies was counted.

For 3D culture studies, cells were seeded ( $5 \times 10^3$  cells per well) in 48-multiwell plates containing an underlying layer of Matrigel, which was pre-incubated at 37 °C during 30 min. The following day, cells were treated with the indicated doses of the drugs. The diameter of invading 3D colonies was monitored daily under a light microscope for 3 days.

#### 4.4. Cell Cycle and Apoptosis Studies

For cell cycle analysis, cells ( $2.5 \times 10^5$  cells in 100 mm plates) were treated with the drugs at the indicated doses for 24 h. Then, cells were harvested by trypsinization, washed with cold PBS and fixed with 70% ethanol for 30 min. After centrifugation, cell pellets were washed with PBS and incubated in the dark with Propidium Iodide (PI)/RNase staining solution (Immunostep S.L., Salamanca, Spain) for 1 h at 4 °C.

For the apoptosis assays, cells were treated as described above but for 72 h. Then, supernatants and cells were collected and washed twice with cold-PBS. For the analysis, cells were stained with Annexin

V-DT-634 (Immunostep S.L., Salamanca, Spain) and 3  $\mu$ L of PI (10 mg/mL) in 1 $\times$  Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaOH, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) for 1 h at room temperature in the dark. Stained cells were immediately analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Early (Annexin V-positive, PI-negative) and late (Annexin V-positive and PI-positive) apoptotic cells were included in the determination of cell death.

#### 4.5. Caspase Activity Assays

Cells ( $5 \times 10^5$ ) were treated with rabusertib, carboplatin, cisplatin at the indicated doses for 72 h. Then, they were lysed in ice-cold apoptosis lysis buffer (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP40, pH 7.0), supplemented with protease inhibitors (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the protein concentration was determined using Pierce BCA (Bicinchoninic acid) protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The final volume of the lysates was taken to 100  $\mu$ L by 1 $\times$  Caspase buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% sucrose). Then, 100  $\mu$ L of Caspase reaction buffer 2  $\times$  (50 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% CHAPS, 20% sucrose, 20 mM DTT and 10  $\mu$ M of fluorescently-labelled caspase substrate Ac-IETD-AFC or Ac-DEVD-AFC) was added to each well containing cell lysates. The plate was shaken to mix the solution and incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 1 h. Signals were measured at 400/505 nm in a fluorescent reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

#### 4.6. Western Blotting

MDA-MB-231 and HS578T were treated with rabusertib, carboplatin, and cisplatin, as described in Section 4.4, for 24 h. Then, cells were lysed and the protein concentration was determined. 50  $\mu$ g of total protein was loaded in an SDS-PAGE electrophoresis system. Blots were blocked in Tris-buffered saline (TBS)-5% milk and incubated overnight with the following primary human antibodies. The anti-GAPDH and anti-PARP antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The anti-pH2AX, anti-pCHK1 (Ser 296) and anti-CHK1 antibodies were from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). Horseradish peroxidase conjugates of anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G (IgG) were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Protein bands were visualized by a luminal-based detection system with p-iodophenol enhancement.

#### 4.7. Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips and treated with the indicated drugs for 72 h. Then, coverslips were washed and cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, rinsed twice with PBS, and blocked in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 4% BSA for 1 h, and subsequently incubated overnight at 4  $^\circ\text{C}$  with anti-cleaved caspase 3 antibody (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The coverslips were washed and incubated with an anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000) antibody for 60 min. DAPI (300 nM) was added for 3 min and the coverslips were washed again twice with PBS before mounting. Fluorescence imaging was performed using a Nikon epifluorescence inverted microscope. The excitation laser power percentage, time of exposition and camera binning were not changed among the different experiments in order to compare the cleaved-caspase 3 expression between conditions.

#### 4.8. Statistical Analysis

One-way ANOVA and the T-Student test was used to determine significant statistical differences ( $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*).

To analyze the synergy studies, the mean CI for each combination was compared with the value of CI = 1 to check if the values were statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9034/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.O., A.P. and E.M.G.-M.; methodology, E.M.G.-M., A.P. and A.O.; investigation, A.A.-S., C.N.-J., S.M.-C., V.C.-S., J.C.M., M.B., M.N.-C. and E.M.G.-M.; resources, E.M.G.-M., A.P. and A.O.; data curation, A.A.-S., C.N.-J., S.M.-C., V.C.-S., J.C.M., M.B., M.N.-C. and E.M.G.-M.; writing—original draft preparation, E.M.G.-M., A.P. and A.O.; writing—review and editing, C.N.-J., E.M.G.-M., A.P. and A.O.; supervision A.P. and A.O.; project administration, A.P. and A.O.; funding acquisition, E.M.G.-M., A.P. and A.O.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121 and PI19/00808), Diputación de Albacete and CIBERONC (to A. Ocana); CRIS Cancer Foundation (to A. Ocana and A. Pandiella); and Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (SBPLY/19/180501/000173) (to E.M. Galan-Moya and A. Ocana). We would also like to thank the Cancer Association, ACEPAIN for supporting part of this work. E.M. Galan-Moya is funded by the Implementation Research Program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds). A. Alcaraz and M. Nuncia-Cantarero are funded by grants from the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. S. Martinez-Canales is funded by a fellowship from the Regional Centre for Biomedical Research of the UCLM (CRIB-UCLM). M. Burgos is funded by a regional fellowship from Biomedicine and Health Science Research (II-2018\_11).

**Conflicts of Interest:** Authors do not have any conflict of interest to declare.

## References

1. Ocana, A.; Pandiella, A. Targeting oncogenic vulnerabilities in triple negative breast cancer: Biological bases and ongoing clinical studies. *Oncotarget* **2017**, *8*, 22218–22234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pagliarini, R.; Shao, W.; Sellers, W.R. Oncogene addiction: Pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 280–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Esparís-Ogando, A.; Montero, J.C.; Arribas, J.; Ocana, A.; Pandiella, A.O. Targeting the EGF/HER Ligand-Receptor System in Cancer. Available online: <https://www.eurekaselect.com/144012/article> (accessed on 21 September 2020).
4. Slamon, D.J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; et al. Use of Chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Planchard, D.; Smit, E.F.; Groen, H.J.M.; Mazieres, J.; Besse, B.; Helland, Å.; Giannone, V.; D’Amelio, A.M.; Zhang, P.; Mookerjee, B.; et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: An open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1307–1316. [[CrossRef](#)]
6. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516. [[CrossRef](#)]
7. Pandiella, A.O.A. Novel Synthetic Lethality Approaches for Drug Combinations and Early Drug Development. Available online: <https://www.eurekaselect.com/137544/article> (accessed on 21 September 2020).
8. Lord, C.J.; Ashworth, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* **2017**, *355*, 1152–1158. [[CrossRef](#)]
9. Muller, F.L.; Aquilanti, E.A.; DePinho, R.A. Collateral lethality: A new therapeutic strategy in oncology. *Trends Cancer* **2015**, *1*, 161–173. [[CrossRef](#)]
10. Saslow, D.; Solomon, D.; Lawson, H.W.; Killackey, M.; Kulasingam, S.L.; Cain, J.; Garcia, F.A.R.; Moriarty, A.T.; Waxman, A.G.; Wilbur, D.C.; et al. American cancer society, american society for colposcopy and cervical pathology, and american society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **2012**, *137*, 516–542. [[CrossRef](#)]
11. Harbeck, N.; Gnant, M. Breast cancer. *Lancet* **2017**, *389*, 1134–1150. [[CrossRef](#)]
12. D’Andrea, A.D.; Grompe, M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 23–34. [[CrossRef](#)]
13. Karnitz, L.M.; Zou, L. Molecular pathways: Targeting ATR in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4780–4785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



14. Han, X.; Tang, J.; Wang, J.; Ren, F.; Zheng, J.; Gragg, M.; Kiser, P.; Park, P.S.H.; Palczewski, K.; Yao, X.; et al. Conformational Change of Human Checkpoint Kinase 1 (Chk1) induced by DNA damage. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 12951–12959. [CrossRef] [PubMed]
15. Dai, Y.; Grant, S. New insights into Checkpoint Kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 376–383. [CrossRef] [PubMed]
16. Kastan, M.B.; Lim, D.S. The Many Substrates and Functions of ATM. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11252893/> (accessed on 21 September 2020).
17. Babiker, H.M.; McBride, A.; Cooke, L.S.; Mahadevan, D. Therapeutic potential of investigational CHK-1 inhibitors for the treatment of solid tumors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26*, 1063–1072. [CrossRef] [PubMed]
18. Thompson, R.; Eastman, A. The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: How mechanistic studies impact on clinical trial design. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *76*, 358–369. [CrossRef] [PubMed]
19. Robson, M.; Im, S.-A.; Senkus, E.; Xu, B.; Domchek, S.M.; Masuda, N.; Delalogue, S.; Li, W.; Tung, N.; Armstrong, A.; et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 523–533. [CrossRef]
20. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 440–446. [CrossRef]
21. Chou, T.-C. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk. Lymphoma* **2008**, *49*, 2059–2080. [CrossRef]
22. Ocana, A.; Pandiella, A.; Siu, L.L.; Tannock, I.F. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 200–209. [CrossRef]
23. Ben-David, U.; Siranosian, B.; Ha, G.; Tang, H.; Oren, Y.; Hinohara, K.; Strathdee, C.A.; Dempster, J.; Lyons, N.J.; Burns, R.; et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **2018**, *560*, 325–330. [CrossRef]
24. Massey, A.J.; Stokes, S.; Browne, H.; Foloppe, N.; Fiumana, A.; Scrace, S.; Fallowfield, M.; Bedford, S.; Webb, P.; Baker, L.; et al. Identification of novel, in vivo active Chk1 inhibitors utilizing structure guided drug design. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35797–35812. [CrossRef] [PubMed]
25. Herúdková, J.; Paruch, K.; Khirsariya, P.; Souček, K.; Krkoška, M.; Vondálová Blanářová, O.; Sova, P.; Kozubík, A.; Vaculová, A.H. Chk1 inhibitor SCH900776 effectively potentiates the cytotoxic effects of platinum-based chemotherapeutic drugs in human colon cancer cells. *Neoplasia* **2017**, *19*, 830–841. [CrossRef] [PubMed]
26. Hinohara, K.; Polyak, K. Intratumoral heterogeneity: More than just mutations. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 569–579. [CrossRef] [PubMed]
27. Hsu, W.-H.; Zhao, X.; Zhu, J.; Kim, I.-K.; Rao, G.; McCutcheon, J.; Hsu, S.-T.; Teicher, B.; Kallakury, B.; Dowlati, A.; et al. Chk1 inhibition enhances cisplatin cytotoxicity and overcomes cisplatin resistance in small cell lung cancer by promoting mitotic cell death. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 1032. [CrossRef] [PubMed]
28. Montero, J.C.; Esparis-Ogando, A.; Re-Louhau, M.F.; Seoane, S.; Abad, M.; Calero, R.; Ocaña, A.; Pandiella, A. Active kinase profiling, genetic and pharmacological data define mTOR as an important common target in triple-negative breast cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 148–156. [CrossRef] [PubMed]
29. Bareche, Y.; Buisseret, L.; Gruosso, T.; Girard, E.; Venet, D.; Dupont, F.; Desmedt, C.; Larsimont, D.; Park, M.; Rothé, F.; et al. Unraveling triple-negative breast cancer tumor microenvironment heterogeneity: Towards an optimized treatment approach. *J. Natl. Cancer Inst.* **2020**, *112*, 708–719. [CrossRef]
30. Ocaña, A.; García-Alonso, S.; Amir, E.; Pandiella, A. Refining early antitumoral drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 922–925. [CrossRef]
31. Pegram, M.D.; Konecny, G.E.; O’Callaghan, C.; Beryt, M.; Pietras, R.; Slamon, D.J. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 739–749. [CrossRef]





**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Article

# Characterization of Permeability Barrier Dysfunction in a Murine Model of Cutaneous Field Cancerization Following Chronic UV-B Irradiation: Implications for the Pathogenesis of Skin Cancer

Juan Luis Santiago <sup>1,2</sup>, Jose Ramon Muñoz-Rodríguez <sup>2,3</sup>, Miguel Angel de la Cruz-Morcillo <sup>2</sup>, Clara Villar-Rodríguez <sup>2</sup>, Lucia Gonzalez-Lopez <sup>3,4</sup>, Carolina Aguado <sup>5</sup> , Miriam Nuncia-Cantarero <sup>6</sup>, Francisco Javier Redondo-Calvo <sup>2,3,\*</sup> , Jose Manuel Perez-Ortiz <sup>2,3,\*</sup>  and Eva Maria Galan-Moya <sup>6,7</sup> 

- <sup>1</sup> Department of Dermatology, University General Hospital, 13004 Ciudad Real, Spain; jlsantiago@sescam.jccm.es
- <sup>2</sup> Translational Research Unit, University General Hospital, 13004 Ciudad Real, Spain; jmunozrodriguez@sescam.jccm.es (J.R.M.-R.); migdela@sescam.jccm.es (M.A.d.l.C.-M.); cvillarr@sescam.jccm.es (C.V.-R.)
- <sup>3</sup> Faculty of Medicine, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain; lgonzalezl@sescam.jccm.es
- <sup>4</sup> Department of Pathological Anatomy, University General Hospital, 13004 Ciudad Real, Spain
- <sup>5</sup> Synaptic Structure Laboratory, Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Universidad de Castilla-La Mancha, 02008 Albacete, Spain; carolina.aguado@uclm.es
- <sup>6</sup> Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, 02008 Albacete, Spain; miriam.nuncia@alu.uclm.es (M.N.-C.); evamaria.galan@uclm.es (E.M.G.-M.)
- <sup>7</sup> Faculty of Nursing, Universidad de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain
- \* Correspondence: ffredondo@sescam.jccm.es (F.J.R.-C.); jmperezo@sescam.jccm.es (J.M.P.-O.); Tel.: +34-926-278-000 (J.M.P.-O.)



**Citation:** Santiago, J.L.; Muñoz-Rodríguez, J.R.; Cruz-Morcillo, M.A.d.l.; Villar-Rodríguez, C.; Gonzalez-Lopez, L.; Aguado, C.; Nuncia-Cantarero, M.; Redondo-Calvo, F.J.; Perez-Ortiz, J.M.; Galan-Moya, E.M. Characterization of Permeability Barrier Dysfunction in a Murine Model of Cutaneous Field Cancerization Following Chronic UV-B Irradiation: Implications for the Pathogenesis of Skin Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 3935. <https://doi.org/10.3390/cancers13163935>

Academic Editor: Chyi-Chia Richard Lee

Received: 20 July 2021  
Accepted: 2 August 2021  
Published: 4 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** In the present work, we developed an experimental preclinical model of skin with cutaneous field cancerization after chronic UV-B light exposure in an immunologically intact mouse model (SKH1 aged mice). We observed impairments in the transepidermal water loss, stratum corneum hydration, and surface pH. We also detected a marked hyperkeratotic hyperplasia of the epidermis, induction of keratinocyte hyperproliferation, incidental actinic keratosis, and in situ squamous cell carcinomas in the UV-B light-irradiated groups. In this context, the association between the permeability barrier impairment and keratinocyte hyperproliferation might be considered a new target in the management of skin with cutaneous field cancerization. As current therapeutic approaches to actinic keratosis and cutaneous field cancerization only focus on the direct antineoplastic, immunomodulatory, or photodynamic effects of approved topical drugs, this mouse model of skin with cutaneous field cancerization might be helpful for both the identification and screening of potentially new preventive strategies or treatments (e.g., skin barrier therapies).

**Abstract:** Chronic ultraviolet B (UV-B) irradiation is known to be one of the most important hazards acting on the skin and poses a risk of developing photoaging, skin with cutaneous field cancerization (CFC), actinic keratosis (AKs), and squamous cell carcinomas (SCCs). Most of the UV-B light is absorbed in the epidermis, affecting the outermost cell layers, the stratum corneum, and the stratum granulosum, which protects against this radiation and tries to maintain the permeability barrier. In the present work, we show an impairment in the transepidermal water loss, stratum corneum hydration, and surface pH after chronic UV-B light exposure in an immunologically intact mouse model (SKH1 aged mice) of skin with CFC. Macroscopic lesions of AKs and SCCs may develop synchronically or over time on the same cutaneous surface due to both the presence of subclinical AKs and in situ SCC, but also the accumulation of different mutations in keratinocytes. Focusing on skin with CFC, yet without the pathological criteria of AKs or SCC, the presence of p53 immunopositive patches (PIPs) within the epidermis is associated with these UV-B-induced mutations. Reactive epidermis to



chronic UV-B exposure correlated with a marked hyperkeratotic hyperplasia, hypergranulosis, and induction of keratinocyte hyperproliferation, while expressing an upregulation of filaggrin, loricrin, and involucrin immunostaining. However, incidental AKs and in situ SCC might show neither hypergranulosis nor upregulation of differentiation markers in the upper epidermis. Despite the overexpression of filaggrin, loricrin, involucrin, lipid enzymes, and ATP-binding cassette subfamily A member 12 (ABCA12) after chronic UV-B irradiation, the permeability barrier, stratum corneum hydration, and surface pH were severely compromised in the skin with CFC. We interpret these results as an attempt to restore the permeability barrier homeostasis by the reactive epidermis, which fails due to ultrastructural losses in stratum corneum integrity, higher pH on skin surface, abundant mast cells in the dermis, and the common presence of incidental AKs and in situ SCC. As far as we know, this is the first time that the permeability barrier has been studied in the skin with CFC in a murine model of SCC induced after chronic UV-B irradiation at high doses. The impairment in the permeability barrier and the consequent keratinocyte hyperproliferation in the skin of CFC might play a role in the physiopathology of AKs and SCCs.

**Keywords:** cutaneous field cancerization; skin cancer; actinic keratosis; UV radiation; permeability barrier; epidermis; keratinocytes; cell proliferation; p53

## 1. Introduction

The skin is constantly exposed to external damage, such as ultraviolet A (UV-A) and ultraviolet B (UV-B) radiation. Due to their different wavelength ranges, UV-A (320–400 nm) and UV-B (280–320 nm) light act on two different levels of the skin, predominantly damaging different tissue layers. UV-A light mainly affects the dermis, whereas UV-B light acts more superficially in the epidermis [1]. Hence, the epidermis protects the body from UV-B radiation, but also from other outside hazards such as pathogenic microorganisms [2], toxic chemicals [3], allergens [4], mechanical insults [5], etc. In addition to this antimicrobial, chemical, and physical barrier, the skin must also prevent both water and electrolyte loss from the internal milieu, which is defined as the permeability barrier. In fact, the regulation of water release from the organism into the atmosphere, known as transepidermal water loss (TEWL), is the main skin function because it is crucial to maintaining the homeostasis of the internal milieu [6–8]. This permeability barrier is constituted by extracellular lipid membranes (extracellular lamellar bilayers), containing cholesterol, free fatty acids, and ceramides [7], and structural proteins, such as filaggrin, loricrin, and involucrin [9], located at the stratum corneum. Hence, TEWL and surface pH are widely used as indicators of the functional integrity of the stratum corneum, which is the most external part of the epidermis [6,10]. On the other hand, chronic UV-B light exposure is the main modifiable factor for skin aging [11,12]. Interestingly, both conditions, age [10,13] and chronic UV-B light exposure [14,15], show permeability barrier derangements.

Although chronic exposure to both UV-A and UV-B radiation induces a variety of harmful effects on human skin, such as epidermal thickening, collagen damage, photoaging, and skin cancer, UV-B light is considered the main cause of nonmelanoma skin cancer [12,15]. High doses of UV-B light may cause cell death (apoptosis) or induce cyclobutene pyrimidine dimers and pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts in the DNA of keratinocytes, leading to mutations that may eventually result in nonmelanoma skin cancer when nucleotide excision repair fails [11,12]. As UV-B radiation acts over large areas of the skin surface, such as the scalp or the face, clinically, it is common to find patients with several lesions in those areas, such as actinic keratoses (AKs) and/or squamous cell carcinomas (SCCs) [16,17]. These lesions may be developed concomitantly or over time on the same skin surface [12,16,17]. Moreover, novel diagnostic tools such as reflectance confocal microscopy [18], optical coherence tomography [19], or in vivo fluorescent diagnosis based on protoporphyrin IX accumulation [20] may detect subclinical AKs in the same area, which are considered precursor lesions in the continuum of SCC. According to

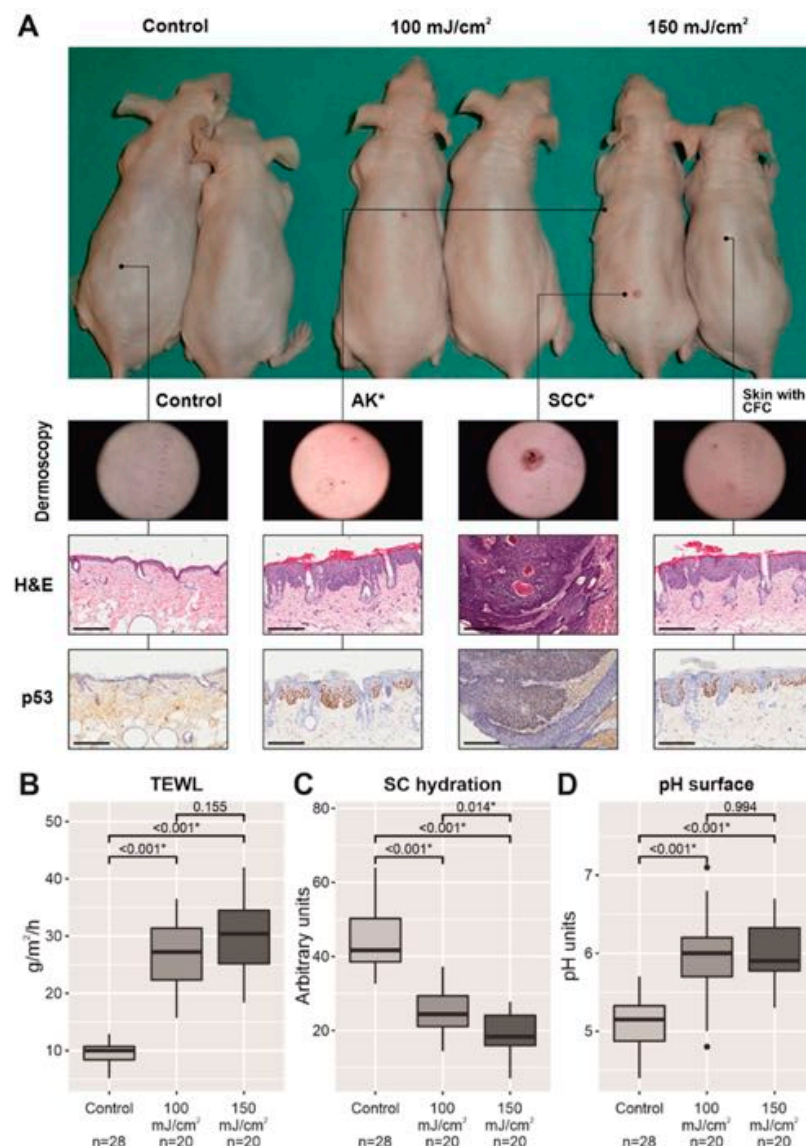
these clinical and histopathological features, the concept of cutaneous field cancerization (CFC) has been proposed to explain not only AKs within the same skin surface but also, thanks to previous diagnostic techniques, the presence of incidental AKs on the same sun-exposed skin [16,18]. This is supported by molecular changes, mainly p53 immunopositive patches (PIPs), which are detected within the epidermis in the cutaneous areas exposed to chronic UV-B radiation [11,12]. In this work, using immunocompetent mice, we established an *in vivo* model of chronic UV-B radiation to characterize the permeability barrier, keratinocyte hyperproliferation, and PIPs. The animals developed lesions in the continuum of photodamaged skin-AK-SCC, according to the naked eye and dermoscopic examination by a dermatologist, and displayed histopathological criteria of skin with CFC, defined as clinical and subclinical lesions (microscopic AKs, microscopic *in situ* SCCs, or PIPs without histopathological criteria of previous lesions within the epidermis). The main histopathological features in the epidermal architecture, such as keratinocyte hyperproliferation (acanthosis) and altered differentiation (hyperkeratosis), keratinocyte atypia, and, finally, molecular changes, such as an overexpression in the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and PIPs within the epidermis, were investigated by a pathologist. As PIPs in sun-exposed skin show p53 mutations in 29–64% of individual studies [21–23], and similar mutations have been described in normal sun/UV-B-irradiated skin and SCCs in human and murine models, it is widely accepted that PIPs may represent early precursors of SCC [22–24]. However, it is accepted that only a small proportion of these patches may progress to SCCs [24]. On the other hand, since keratinocyte differentiation plays a key role in epidermis homeostasis to form the stratum corneum and maintain the permeability barrier, lipid enzymes, the lipid transporter ATP-binding cassette subfamily A member 12 (ABCA12), and structural proteins linked to the skin barrier function (filaggrin, loricrin, and involucrin) were also studied for *in vivo* mRNA and protein expression by qPCR and Western blotting (WB). Finally, phenotypic changes, such as skin thickening, a scaly appearance, cutaneous dryness, and erythema, which characterized the cutaneous surface in our mouse model of skin with CFC, were correlated with Nile red and immunohistochemical staining for lipid and differentiation markers (filaggrin, loricrin, and involucrin), respectively, in the outermost layers of the epidermis.

## 2. Results

### 2.1. Chronic UV-B Irradiation Produced an Impairment in the Permeability Barrier in Skin with CFC

After the development of a few macroscopic AKs and/or SCCs, the back skin of the mice in both UV-B-irradiated groups showed quite homogeneous changes in appearance. A total of 21 tumors were identified as SCCs in 10 mice and 39 macroscopic AKs in 10 mice, and six tumors and 24 AKs (100 mJ/cm<sup>2</sup>, *n* = 5) and 15 tumors and 15 AKs (150 mJ/cm<sup>2</sup>, *n* = 5), were found in the irradiated skin (Table A1). In addition to macroscopic AKs and SCCs, the irradiated skin was mainly characterized by marked thickening, which masked the typical milia cysts in aged mouse skin, erythema, dryness, and scaly surface in comparison to nonirradiated skin (Figure 1A). The macroscopic features of the skin with CFC, excluding incidental AKs and *in situ* SCC patches (Figure A1 and Table A1), were mainly correlated with: (1) hypergranulosis with orthokeratotic acanthosis (cutaneous thickness); (2) hyperkeratosis (scaly appearance); (3) increased vascularity consisting of ectatic blood vessels in the upper dermis; and (4) abundant mast cells in the dermis (erythematous skin) (Figure A2 and Table A1). Upon examination with the naked eye, there were no clear differences between the animals in the two groups exposed to different energies of UV-B light. However, TM300 m and corneometer probes were more sensitive to changes between the groups exposed to different doses of UV-B radiation. While TEWL significantly increased in both groups exposed to chronic UV-B light (26.78 ± 1.28 g/m<sup>2</sup>/h, 100 mJ/cm<sup>2</sup>, *p* < 0.001; 29.9 ± 1.55 g/m<sup>2</sup>/h, 150 mJ/cm<sup>2</sup>, *p* < 0.001) with respect to the nonirradiated group (9.39 ± 0.38 g/m<sup>2</sup>/h) (Figure 1B), there was a significant decrease in stratum corneum hydration level (25.19 ± 1.24, 100 mJ/cm<sup>2</sup>, *p* < 0.001; 18.86 ± 1.39, 150 mJ/cm<sup>2</sup>, *p* < 0.001) in a dose-dependent manner with respect to the control group

( $43.59 \pm 1.43$ ) (Figure 1C), which correlated with the scaly surface and dryness. Moreover, the surface pH also significantly increased from its physiological acidic value ( $5.11 \pm 0.07$ ) to higher levels ( $6.00 \pm 0.13$ ,  $100 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $p < 0.001$ ;  $6.02 \pm 0.09$ ,  $150 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1D). The intensity of keratinocyte atypia (keratinocyte pleomorphism and atypical mitosis), its extension within the epidermis (architectural disruption), from the basal layer to upper layers, and the number of patches of microscopic AKs and in situ SCCs increased in the UV-B-irradiated group at  $150 \text{ mJ/cm}^2$  in comparison to the UV-B-irradiated group at  $100 \text{ mJ/cm}^2$  (Table A1). Mast cell infiltrates were detected in the upper and deep dermis of the UV-B-irradiated skin, increasing in a dose-dependent manner with respect to the control group (Figure A2).



**Figure 1.** Skin appearance of two mice per group after UV-B irradiation, twice daily, 3 times per week, for 2 weeks, and then every day for another 12 weeks, from left to right: nonirradiated mice (control group), irradiated mice with  $100 \text{ mJ/cm}^2$  (middle), and irradiated mice with  $150 \text{ mJ/cm}^2$  (right). Macroscopic AKs and SCC, marked with an asterisk, were excluded from permeability, stratum corneum hydration, and surface pH measurements. The scale bar represents  $200 \mu\text{m}$  (A). Plots with the three physiological parameters linked to the permeability barrier in nonirradiated mice (control group) and UV-B-irradiated groups with CFC (excluding skin areas with macroscopic AKs and/or SCC): TEWL values (B), stratum corneum hydration (C), and surface pH (D). \*  $p < 0.05$ .

## 2.2. Chronic UV-B Irradiation Caused Epidermal Hyperplasia, PCNA Overexpression, and PIPs, Linked to the Skin with CFC

To investigate whether chronically UV-B-irradiated skin exhibited epidermal changes with CFC according to a pathologist, homogeneous skin samples from the mouse backs were taken by a dermatologist to check the presence of patches of subclinical AKs or in situ SCCs within an epidermis with orthokeratotic acanthosis and hypergranulosis (Figure 2A, Table A1), and an overexpression in PCNA and PIPs (Figure 2A,B). AKs and in situ SCCs were characterized by parakeratotic acanthosis and the extension of the keratinocyte atypia into the upper epidermis, indicating the presence of inflammatory infiltrates in the upper dermis. The skin with CFC was defined by the presence of epidermal hyperplasia (hypergranulosis with orthokeratotic acanthosis) together with molecular markers, such as an increase in PCNA immunostaining and PIPs restricted to the lower levels of the epidermis, in the absence of keratinocyte atypia and inflammatory infiltrates. The epidermal thickness significantly increased in both UV-B-exposed groups (100 mJ/cm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ; 150 mJ/cm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ) in comparison to the control group, while PCNA immunostaining and PIPs also led to an increase in both UV-B-exposed groups, with significant changes in the 150 mJ/cm<sup>2</sup> group ( $p < 0.001$ ), in sharp contrast to the nonirradiated group (Figure 2A,B).

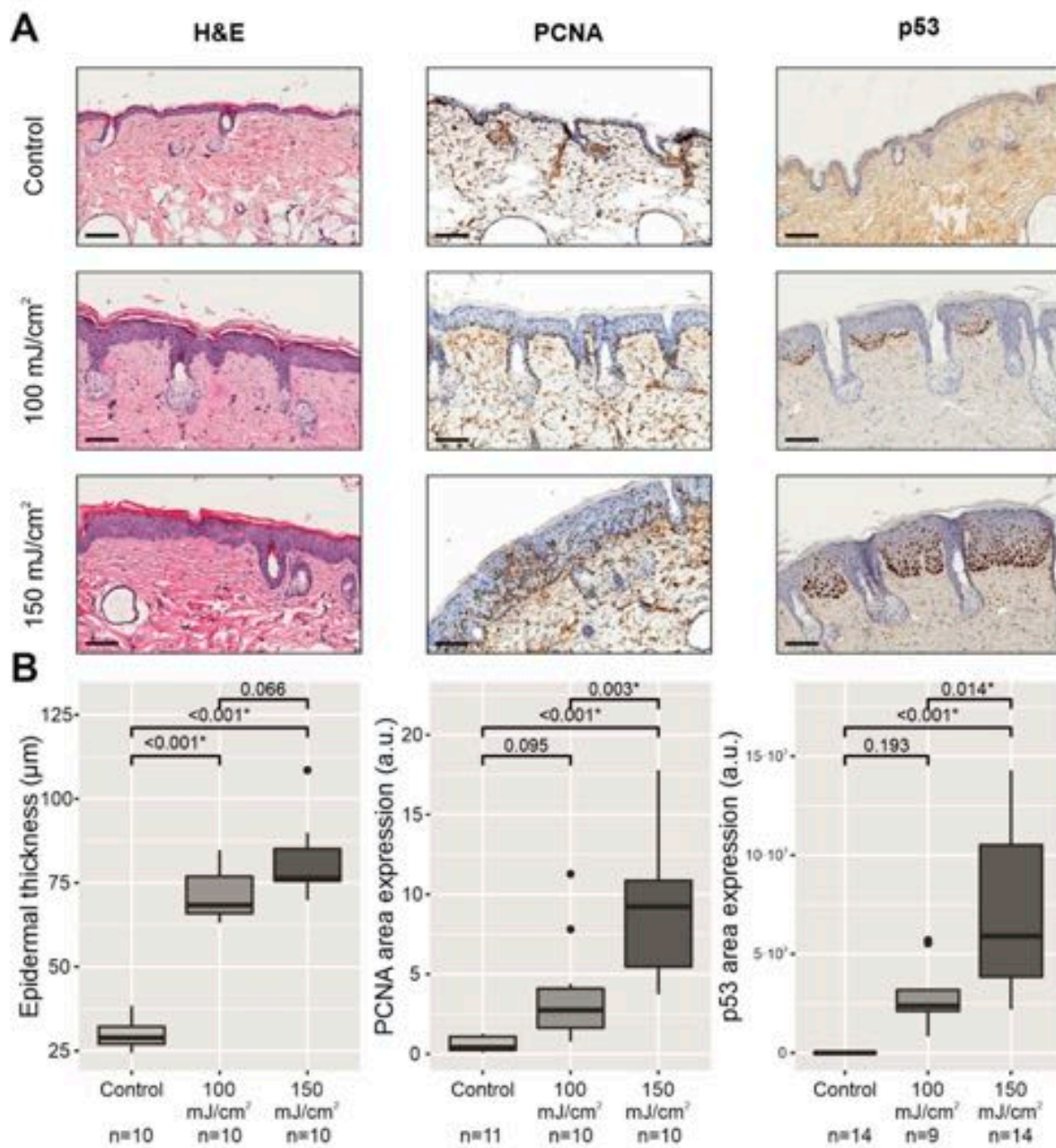
## 2.3. Chronic UV-B Exposure of Skin with CFC Upregulated the mRNA Expression and Protein Synthesis of Several Biomarkers Linked to the Permeability Barrier

Epidermal differentiation and lipid production largely determine the formation of the epidermal permeability barrier in the stratum corneum. Because there was an increase in TEWL in the apparently homogeneous skin with CFC of both groups exposed to UV-B light with respect to the nonirradiated skin in the control group (Figure 1B), we next aimed to assess whether the skin barrier disruption could be attributable to the downregulation of epidermal differentiation markers and lipid production in the outermost cell layers of the epidermis. First, immunostaining showed a significant overexpression for all three differentiation markers in the stratum corneum in both UV-B-irradiated groups compared to the nonirradiated group: filaggrin ( $p = 0.032$ , 100 mJ/cm<sup>2</sup>;  $p = 0.002$ , 150 mJ/cm<sup>2</sup>), loricrin ( $p < 0.001$ , 100 mJ/cm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ , 150 mJ/cm<sup>2</sup>), and involucrin ( $p < 0.001$ , 100 mJ/cm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ , 150 mJ/cm<sup>2</sup>) (Figure 3A,B).

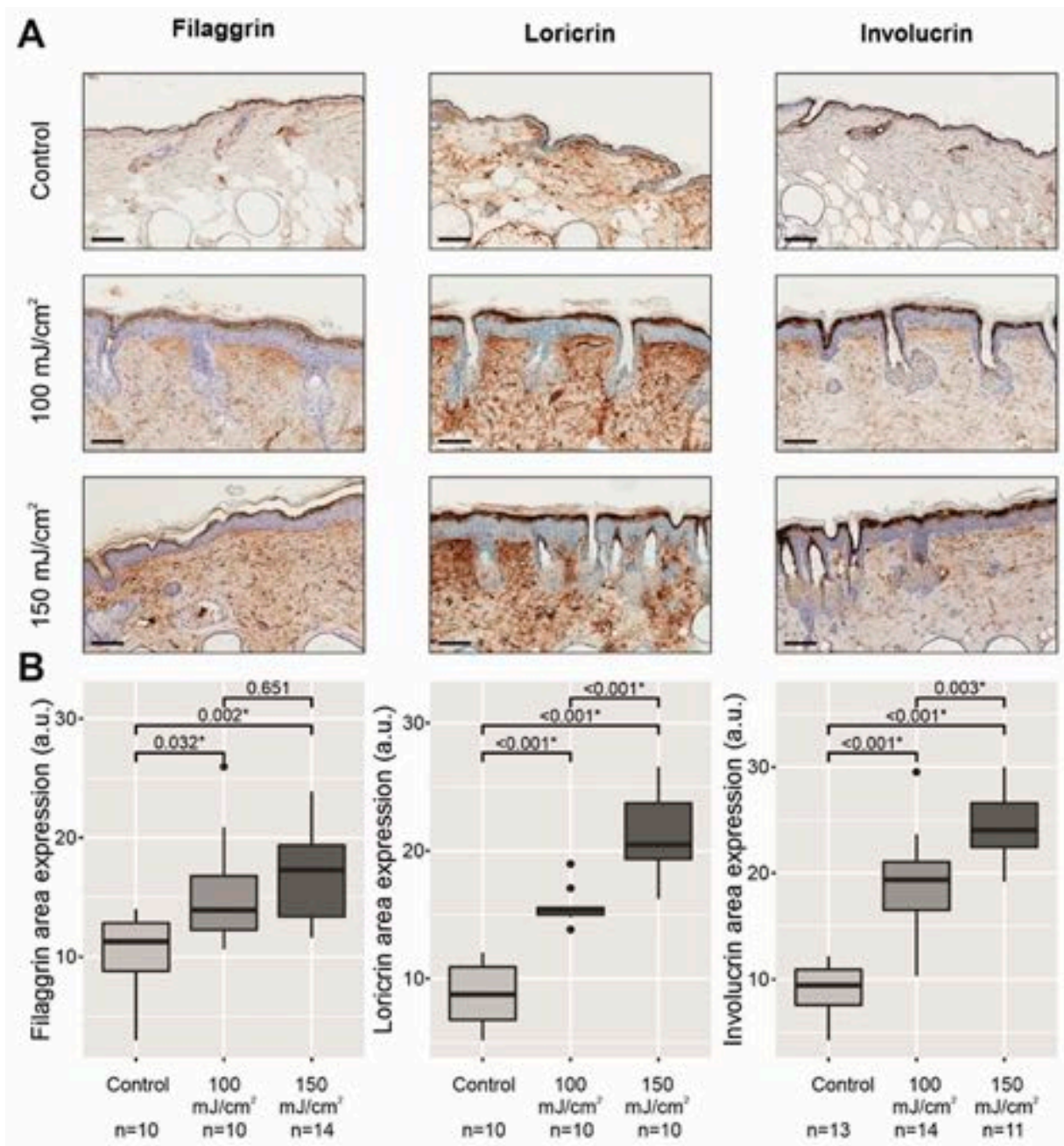
The immunohistochemistry results were further confirmed through the evaluation of protein levels by WB (Figure 4A and Figure S1). Similarly, the expression of the three proteins was found to be more marked in the UV-B-irradiated groups in comparison to the control group. However, these differences at the protein level were not fully matched when the mRNA expression of the genes coding for these differentiation markers was assessed by qPCR, where only filaggrin at 150 mJ/cm<sup>2</sup> showed a significant higher level (Figure 4B).

Next, lipid production was also investigated in the epidermis. In a first step, Nile red staining showed more lipids in the outermost layers of the hyperplastic epidermis in the irradiated skin of both UV-B-exposed groups with respect to the nonirradiated group (Figure A3). Then, we decided to evaluate the mRNA expression of key lipid enzymes (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMGCoA reductase; fatty acid 2-hydroxylase, FA2H; and elongation of very long chain fatty acids protein 4, ELOVL4) and a lipid transporter (ABCA12), comparing the nonirradiated group with the UV-B-irradiated groups. The *in vivo* mRNA expression for the lipid enzyme FA2H was significantly upregulated ( $p = 0.015$ ) in the UV-B-irradiated group (150 mJ/cm<sup>2</sup>) in comparison to the nonirradiated skin (Figure A3).

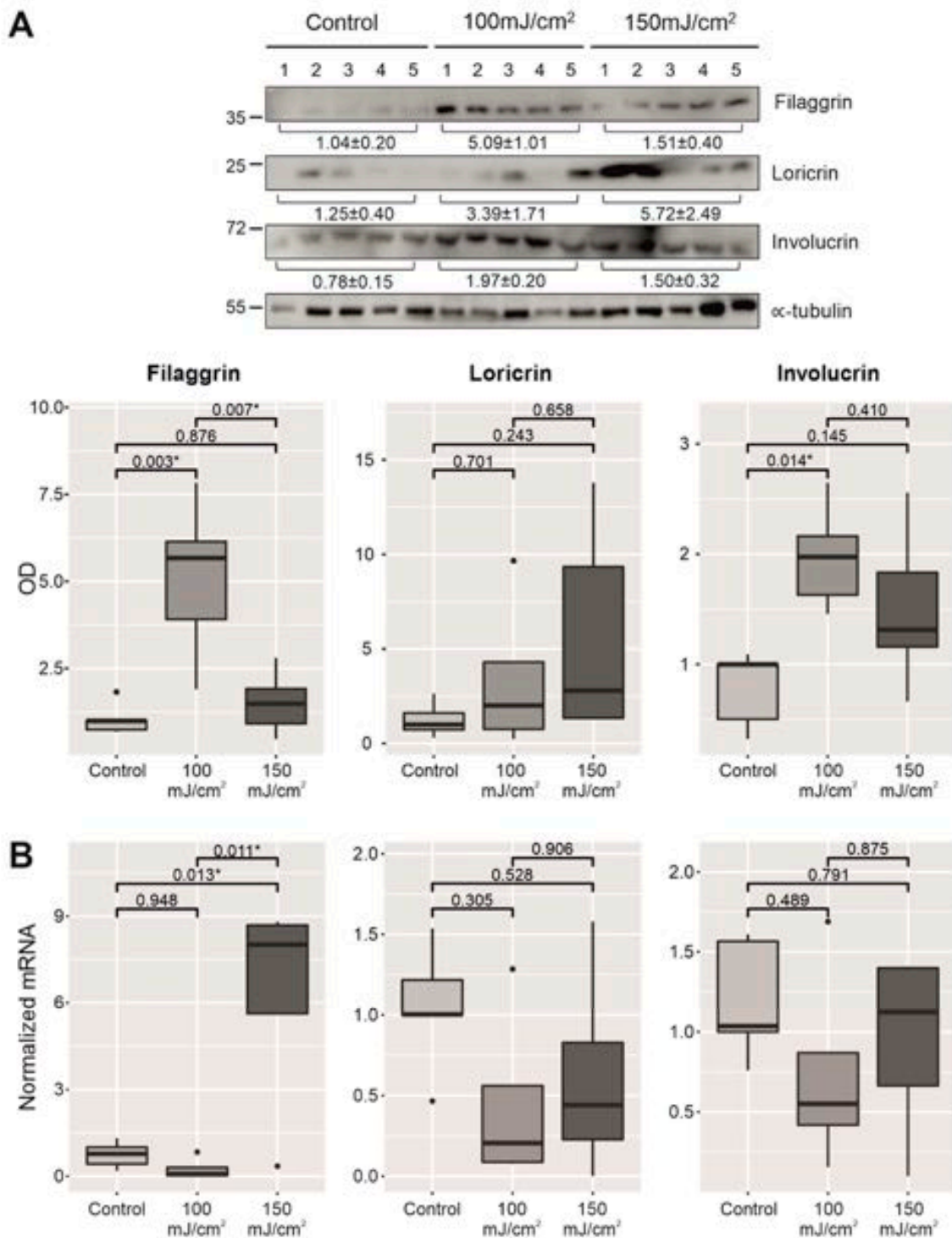




**Figure 2.** Comparative histology of nonirradiated skin with respect to UV-B-irradiated skin with CFC of the mouse back at the end of the experiment (14 weeks after initiating UV-B irradiation). The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$  (A). Below the histopathological images, plots represent the epidermal thickness and quantification of PCNA immunostaining and PIPs using ImageJ software and are expressed in arbitrary units (a.u.) (B). \*  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** Comparative histology of nonirradiated skin with respect to UV-B-irradiated skin with CFC of the mouse back at the end of the experiment (14 weeks after initiating UV-B irradiation). From left to right, filaggrin, loricrin, and involucrin immunostaining in the upper epidermis. The scale bar represents 100  $\mu$ m (A). Below, there is a quantitative analysis of the immunostaining for each differentiation marker using ImageJ software and expressed in arbitrary units (a.u.) (B). \*  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** Comparative protein expression of the main differentiation markers linked to the permeability barrier (filaggrin, loricrin, and involucrin) of two groups exposed to UV-B irradiation, 100 mJ/cm<sup>2</sup> and 150 mJ/cm<sup>2</sup>, with respect to the nonirradiated group (A). Below, comparative mRNA relative expression levels of these three genes in UV-B-irradiated skin, 100 mJ/cm<sup>2</sup> and 150 mJ/cm<sup>2</sup>, with respect to the nonirradiated group (B). \*  $p < 0.05$ .

### 3. Discussion

The permeability barrier depends on both the structure and chemical composition of the stratum corneum, which consists of a cell component (corneocytes) surrounded by a neutral lipid-enriched extracellular matrix (extracellular lamellar bilayers), providing a hydrophobic barrier against the movement of water and electrolytes [6,7,9]. At the



ultrastructural level, this permeability barrier depends on the integrity and cohesion of both corneocytes and the extracellular lamellar bilayers of the stratum corneum. Lamellar bodies are located in the stratum granulosum, where they supply the lipids for the cornified envelopes as well as the components to form the extracellular lamellar bilayers of the stratum corneum. Several *in vivo* studies have investigated the UV-B-induced abnormal lamellar structures in the stratum corneum [25–27]. Following a single dose of UV-B light (150 mJ/cm<sup>2</sup>), defective lamellar bilayers were observed in the presence of an altered calcium gradient in murine epidermis. Because this altered calcium gradient may affect the secretion of lamellar body-derived lipids and enzymes to stratum corneum intercellular space, this might be an explanation for the abnormal lamellar bilayers [28].

SKH1 mice were used to establish a disease model of skin with CFC. Due to the proviral insertion of the murine leukemia virus at Hr locus, which leads to a recessive hypomorphic mutation, these mice do not develop fur but, contrary to nude mice, they are still immunocompetent [29]. According to Pillon et al., as most AKs and SCCs arise in elderly individuals who show structural differences in the skin with respect to younger individuals, SKH1 aged mice might be used to optimize their mouse model of AK [30]. Another reason to use SKH1 aged mice was because the skin barrier differs depending on age, showing an impairment in the elderly [13]. Following a previous murine model of nonmelanoma skin cancer [31], we decided to perform a chronic UV-B irradiation three times per week during the first 2 weeks. Then, we irradiated five times per week until the development of the first macroscopic lesions of SCC and AKs to accelerate the process. As soon as the first lesions were observed, we stopped irradiations and took skin samples with a homogeneous aspect: thicker, scaly, and erythematous skin. The doses of UV-B irradiation were chosen according to previous papers of chronic UV-B irradiation and carcinogenesis [32,33]. We characterized different physiological parameters of skin barrier and histopathological features of the skin with CFC (epidermal thickness, PCNA immunostaining, and PIPs overexpression). The epidermal hyperplasia and hypergranulosis were observed in the skin with CFC, which were compatible with a reactive epidermis to chronic UV-B irradiation at high doses. Pathological examination also demonstrated incidental AKs and *in situ* SCC surrounded by this reactive epidermis. Interestingly, in human skin with AKs and photodamage, *in vivo* reflectance confocal microscopy images have shown stratum corneum disruption and dermal inflammatory cells, which have been correlated with hyperkeratosis, keratinocyte atypia, and architectural disruption within the epidermis. Photodamaged skin also displayed keratinocyte atypia and architectural disruption, although this was generally less severe than in AKs, supporting the view that photodamaged skin and AKs are part of a disease continuum and photodamaged skin corresponds to CFC [34].

The skin with CFC showed different macroscopic characteristics such as erythema, scaliness, and dryness, which correlated with an increase in TEWL, lower stratum corneum hydration, and higher values of surface pH. Concurrently, most of the biomarkers linked to the permeability barrier, such as differentiation markers (filaggrin, loricrin, and involucrin), ABCA12, and two epidermal lipid enzymes (i.e., FA2H and ELOVL4), were upregulated in the epidermis of the irradiated groups. However, considering the immunostaining of differentiation markers in the upper epidermis, both incidental AKs and *in situ* SCC showed lower or null staining for these proteins. These immunohistopathological features were confirmed at the molecular level by WB, where an increase was observed for most of the conditions, reaching statistical significance for filaggrin and involucrin (100 mJ/cm<sup>2</sup>). Moreover, a significant increase in filaggrin mRNA levels at the 150 mJ/cm<sup>2</sup> dose was found, a result also in line with the increase observed at the protein level in the histological studies. No significant differences were found for the rest of the conditions. One explanation for these outcomes might be the selection of areas with reactive epidermis (i.e., epidermal hyperplasia with hypergranulosis) to quantify immunostaining, while excluding skin with incidental AKs and *in situ* SCC according to pathological examination. However, skin samples for WB and qPCR were whole extracted (including incidental AKs and *in situ*



SCC). In line with our histological examination, a recent study also showed a downregulation of filaggrin and other differentiation markers in AKs even at early stages [35]. On the other hand, previous studies with chronic UV-B irradiation in SKH1 mice have shown that changes in mRNA expression of other genes linked to permeability barrier depend on the moment that samples were collected [36].

The final effect of UV-B exposure in the epidermis might depend on both intensity and duration. For example, a single UV-B exposure was able to induce hyperproliferation and downregulation of filaggrin, involucrin, and loricrin expression in normal human skin grafted on to nude mice, recovering completely within 2 weeks after UV-B irradiation [37]. However, low doses of UV-B irradiation accelerated the skin barrier recovery, while increasing the expression of filaggrin and involucrin in SKH1 mice [38]. In humans, UV-B irradiation also promoted epidermal proliferation and upregulation of filaggrin, loricrin, and involucrin by immunostaining, increasing linearly according to dose and repetition [39]. Similarly to our study, chronic UV-B irradiation of SKH1 mice has been linked to an upregulation of filaggrin, loricrin, and involucrin in the upper epidermis together with an increase of TEWL in a murine model of photoaging [40,41]. To our knowledge, this is the first time that both permeability barrier and epidermal differentiation markers (filaggrin, loricrin, and involucrin) have been studied in the skin with CFC after chronic UV-B irradiation at high doses.

On the other hand, despite the impairment in the permeability barrier, a qualitative increase in the epidermal lipids in the outermost cell layers of the epidermis was observed with Nile red staining in both UV-B-irradiated groups. This feature correlated with an upregulation in the mRNA levels of ABCA12, a lipid transporter located in the lamellar bodies, and two key lipid enzymes, FA2H and ELOVL4, in the epidermis of the UV-B-irradiated groups. These two lipid enzymes are linked to the synthesis of ceramides in the stratum granulosum, which are involved in the formation of the lipid-enriched lamellar bilayers of the stratum corneum [7]. Dalmau et al., using *in vitro* studies, also showed an increase in involucrin and phospholipids, one of the main sources of free fatty acids in the stratum corneum, following chronic UV-B irradiation [42]. Interestingly, Löwenau et al. demonstrated that reconstructed human epidermis from UV-B-irradiated keratinocytes presented altered differentiation and impaired barrier function leading to increased permeability [43]. Although this reconstructed human epidermis from UV-B-irradiated keratinocytes displayed a thinner stratum corneum compared to normal reconstructed human epidermis, a reactive epidermis to chronic UV-B irradiation, characterized by orthokeratotic hyperplasia with hypergranulosis and PCNA and PIPs overexpression, together with several patches of incidental AKs or *in situ* SCCs associated with hypogranulosis were the main features in our murine model of skin with CFC. These differences in the epidermal architecture can be explained if we consider that, similarly to other published murine models of AKs and NMSC [22,30,31], our model in SKH1 mice represents a better approach to the complexity of the skin with CFC than *in vitro* models, including reconstructed human epidermis.

There are alternative explanations for the impairment of the permeability barrier despite an increase in several biomarkers linked to the skin barrier. Abnormal keratinocyte differentiation affects the cohesion of the stratum corneum, desquamation, permeability barrier homeostasis, and inflammation in the skin [8,44]. During normal desquamation, corneocytes detach individually from the stratum corneum in an invisible process, which involves proteolytic degradation of corneodesmosomes, disorganization of extracellular lamellar bilayers, and stratum corneum hydration [45]. The scaly appearance and dryness of the skin with CFC, including incidental AKs and *in situ* SCCs, which correlated with hyperkeratosis, indicate an abnormal desquamation. In fact, previous ultrastructural studies demonstrated loss in the stratum corneum integrity with respect to both of its components: corneocytes and extracellular lamellar bilayers [25–27]. These losses in stratum corneum integrity, which are mainly linked to the lipid structures (lamellar bilayers), might explain both the increase in TEWL and the concurrent decrease in stratum corneum hydration despite the upregulation of several biomarkers of the permeability barrier in the reactive

epidermis (skin with CFC). On the other hand, higher values in surface pH might also affect the stratum corneum integrity through an increased activity of serine proteases, which degrade the corneodesmosomes, while impairing the formation of extracellular lamellar bilayers by diminishing the activity of lipid processing enzymes ( $\beta$ -glucocerebrosidase, sphingomyelinase, and phospholipase A2) [46–48]. Finally, although we did not study the changes in tight junctions in the stratum granulosum, these structures also play an important role in maintaining the permeability barrier after UV-B irradiation [49].

Like previous studies in chronically UV-B-irradiated skin in mice and humans, abundant mast cells were found in the dermis of the skin with CFC of our murine model [50,51]. Degranulation of dermal mast cells might explain why ectatic blood vessels were a common feature in the skin with CFC, correlated with its erythematous appearance [52]. Moreover, mast cells are also believed to play important roles in UV-induced immunosuppression and the development of SCCs [53,54]. Interestingly, histamine H1 and H2 receptor antagonists, topically applied, accelerate permeability barrier recovery after tape stripping and prevent epidermal hyperplasia with skin barrier disruption by acetone in murine models [55].

Hyperkeratosis, epidermal hyperplasia, and hypergranulosis due to keratinocyte hyperproliferation were the main histopathological features after chronic UV-B irradiation at high doses. Although hypogranulosis and parakeratotic acanthosis were found in incidental AKs and in situ SCCs, the most common changes in the skin with CFC were orthokeratotic acanthosis and hypergranulosis. Those features might be considered as a reactive epidermis after chronic UV-B exposure. Albibas et al. have recently reported that normal sun-exposed skin with PIPs contains multiple mutations in cancer-related genes, indicating that the clonal evolution of mutations that are detected within AKs and SCCs can also occur in PIPs within normal sun-exposed skin [56]. Because permeability barrier disruption also activates keratinocyte proliferation through epidermis-derived growth factors (amphiregulin and NGF) in an autocrine manner, this should be considered in the context of extended photodamaged areas with histopathological and molecular criteria (PCNA and PIP overexpression) of skin with CFC and incidental AKs, where clonal populations of atypical keratinocytes carrying multiple mutations in SCC-related genes might be additionally stimulated to expand within the epidermis [57–59]. Even though our results could potentially link permeability barrier disarrangements observed in the skin with CFC with keratinocyte hyperproliferation and mast cell infiltrates, it is important to emphasize that sustained barrier disruption alone does not suffice to produce SCC. The development of SCC requires UV-B-induced mutations in keratinocytes, its accumulation in key genes, and dysfunction of the immune system [11,12].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

Hairless mice (Crl:SKH1- $Hr^{rh}/Hr^{rh}$ ) were obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain-sur-L'Arbresle, France) and raised in a pathogen-free (SPF) facility with controlled temperature and humidity conditions at the Translational Research Unit of University General Hospital (Ciudad Real, Spain), until the age of 8 months and then used for all in vivo experiments. All mice were fed a standard rodent diet (Safe, Augy, France) and given tap water ad libitum. This study was reviewed and approved by the Animal Care Committee of the abovementioned hospital (Procedure ES130340000192). Animals were handled and cared for in strict accordance with the European Council and Spanish Directives (2010/63/EU, RD 53/2013), under the supervision of authorized investigators.

### 4.2. Assessment of Chronic UV-B Irradiation and Development of CFC

Hairless male SKH1 mice were kept at a 12 h light/dark cycle in the animal facility. SKH1 mice were placed in common housing (maximum: 5 mice/cage) and divided into three different experimental groups: nonirradiated control ( $n = 7$ ), exposed to UV-B light (302 nm) at 100 mJ/cm<sup>2</sup> ( $n = 5$ ), and exposed to UV-B light (302 nm) at 150 mJ/cm<sup>2</sup> ( $n = 5$ ). The UV-B exposed groups were irradiated 3 times per week (Monday, Wednesday, and

Friday) for 2 weeks, and then, every day for another 12 weeks. Eight-month-old SKH1 mice display phenotypic changes of aging (pale, thin, and dry skin with milia cysts), which is the reason why they can be considered as aged mice. After chronic UV-B irradiation, mice were 11.5 months old (normal life expectancy of hairless mice is up to 24 months).

Mice were irradiated using an Ultraviolet Crosslinker (CL-1000 model) supplied by UVP (Upland, CA, USA). The crosslinkers are designed to measure and control UV radiation within the exposure chamber. A UV sensor continually measured the UV energy and automatically adjusted to variations in UV intensity that occur when the UV tubes age. The same UV sensor was used to set UV mice exposure; it automatically deactivates the UV sources when the set UV energy dose has been achieved.

Each mouse in the UV-B-irradiated groups was examined once a week for the appearance of macroscopic AKs and/or SCCs. Growths that were >1 mm in diameter, persisted for at least 2 weeks, and showed dermoscopic features, such as hyperkeratosis, pink bumps, polypoid or verrucous growths, crusts, and atypical blood vessels, were defined as SCCs and recorded per individual and group. Macroscopic AKs were defined as tiny (less than 5 mm in size) pink, scaly lesions without atypical blood vessels during a dermoscopy assessment. The endpoint of this experiment was the development of several macroscopic AKs and/or a few SCCs (<8 mm in diameter) on the irradiated mouse back of both groups, which was defined as skin with CFC, after its evaluation with both the naked eye and dermoscopy (Heine Delta 20<sup>®</sup>T, Gilching, Germany) by a dermatologist. Later, these lesions were characterized by an experienced pathologist in nonmelanoma skin cancer, who also identified incidental (microscopic) AKs, in situ SCCs, and PIPs within the hyperplastic epidermis.

#### 4.3. Measurement of the Skin Barrier Parameters in Skin with CFC

Transepidermal water loss (TEWL) rates, stratum corneum hydration, and surface pH on the irradiated skin of the mouse back were measured with TM300m, corneometer, and surface pH meter probes, attached to a Courage + Khazaka MPA5 system (Courage + Khazaka, Cologne, Germany). All the measurements were performed under controlled atmospheric conditions (23 °C; 60% relative humidity) after the mice developed several AKs and a few SCCs (<8 mm in diameter), which was defined as skin with CFC after UV-B irradiation ( $n = 5$ , 100 mJ/cm<sup>2</sup>;  $n = 5$ , 150 mJ/cm<sup>2</sup>). Probes were placed on four different areas on the irradiated skin of each mouse by a dermatologist, who excluded lesions of AKs and SCCs visible to the naked eye/dermoscopic examination. All skin barrier parameters were also determined in the mouse back of nonirradiated SKH1 aged mice ( $n = 7$ ) of the same age as the two UV-B-irradiated groups when the endpoint of the postradiation skin with CFC was achieved (11.5 months old), under the same controlled atmospheric conditions, which were used as the control group.

#### 4.4. Histological and Immunohistochemical Analyses

After the measurement of skin barrier parameters in the skin with CFC, UV-B-irradiated SKH1 mice were sacrificed. Biopsies ( $n = 5$  per group; total = 15), 1.5 cm<sup>2</sup>, were excised from the irradiated skin of the mouse back (UV-B irradiated groups) or the same skin area in nonirradiated mice (control group), paraformaldehyde-fixed (24 h), and paraffin-embedded. Four-micrometer-thick sections were processed. Hematoxylin/eosin staining (DakoCytomation, Milan, Italy) was performed to measure the epidermal thickness (acanthosis with ortho- or parakeratosis) and to check keratinocyte atypia by an experienced pathologist. Giemsa staining (Merck, Darmstadt, Germany) was used to detect mast cells in the dermis. For immunohistochemistry, dewaxing and antigen retrieval were performed by immersing the slides in EnVision<sup>™</sup> Flex Target Retrieval Solution and heating in the PT module, according to the manufacturer's instructions. After pre-treatment, the slides were incubated with the following primary antibodies for 30 min: filaggrin 1:500 (Biolegend, San Diego, CA, USA), lorricrin 1:1800 (Abcam, Cambridge, UK), involucrin 1:500 (Biolegend), PCNA 1:150 (Agilent, Madrid, Spain), and p53 1:750 (CM5,

Leica Pleasanton, CA, USA). The reactions were detected using the EnVision™ Flex/HRP Detection Reagent (Cat. no K8000; DakoCytomation) standard polymer technique. In addition, the signal intensity was amplified using EnVision™ Flex+ Rabbit linker (Cat. no. K8009; DakoCytomation). Finally, sections were counterstained with hematoxylin and mounted with DePex (VWR, Poole, UK). Negative controls were obtained by omitting the primary antibody. For immunostaining quantification for area expression, samples were first scanned by a computer-assisted image system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and later analyzed to quantify staining and compare samples of the two groups exposed to UV-B light with respect to the nonirradiated group using ImageJ software version 1.52a (NIH, Bethesda, MD, USA).

To localize and perform a qualitative evaluation of the lipids in the epidermis, 0.001% Nile red (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in acetone plus 75% glycerol in deionized water was used in frozen tissue sections and then examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 90i, Tokyo, Japan), after 5 min, 530/25 nm excitation, at 590/35 nm emission.

#### 4.5. Western Immunoblotting

After skin excision and the removal of subcutaneous fat with a scalpel, samples were chosen after excluding areas with macroscopic AKs or SCCs and deposited in a Petri dish with phosphate-buffered saline. After that, the Petri dishes were placed in a water bath at 60 °C for 1 min in order to facilitate the epidermis removal from the subjacent dermis using a scalpel. Then, the epidermal fractions ( $n = 5$  for each group) were processed for Western blotting. After mechanical and enzymatic disaggregation in ice-cold RIPA lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/mL leupeptin) for 30 min, samples were centrifuged at 10,000 $\times g$  for 10 min to remove the insoluble material and purify the extract. Then, the protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After the addition of a loading buffer (5 $\times$  Thermo Fisher Scientific) and protein denaturalization, 50  $\mu$ g of the total protein lysate was used to perform 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, the proteins in gels were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Then, membranes were blocked (1 h) with 5% skimmed milk in Tween-Tris-buffered saline (T-TBS) (100 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Primary human monoclonal/polyclonal antibodies against loricrin (1:500, Abcam, Cambridge, UK), filaggrin (1:500, Abcam), involucrin (1:500, Abcam), and alpha-tubulin (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) were used to incubate the membranes overnight at 4 °C. Then, after extensive washing with T-TBS, membranes were incubated with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies for 1 h at room temperature, and protein bands were visualized by chemiluminescence using the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Amersham, UK) and a LAS-4000 developer (Fujifilm, Tokyo, Japan). The images obtained were quantified by performing a densitometric analysis of the different bands, using ImageJ software. The values (given as arbitrary units) were normalized by considering the total protein levels of each sample. In all cases, alpha-tubulin was used as a loading control.

#### 4.6. qPCR for mRNA Expression

Total RNA was isolated from the skin of the mouse back of the UV-B-irradiated groups (100 and 150 mJ/cm<sup>2</sup>) and from the back of the nonirradiated group ( $n = 5$  for each group) using TRI Reagent (Applied Biosystems, Madrid, Spain). RNA concentrations and purities were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). First strand cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using the Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), in a thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), under the following reaction conditions: 37 °C for 2 min, 25 °C for 10 min,

50 °C for 15 min and 85 °C for 5 min. The resulting cDNAs were subjected to quantitative real-time PCR analysis using a Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in a LightCycler® 480 Instrument II Real-Time PCR system (Roche, Basel, Switzerland). The conditions used included an initial step at 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s. Each sample was analyzed in triplicate, and the cycle threshold (Ct) values of transcripts were determined using LightCycler® 480 software version 1.5. Ct values were calculated using 18S RNA as a reference. The quantification was performed by analysis of relative gene expression data using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [60], with 18S RNA expression level as housekeeping gene. Primer sequences are listed in Table A2. The relative expression of the mRNAs in the UV-B-irradiated groups (100 and 150 mJ/cm<sup>2</sup>) were compared to the control mRNA of nonirradiated mice of the same age. Data are expressed as the fold increases over the controls.

#### 4.7. Statistics

All the data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed using the SPSS software (version 24.0 for Windows, IBM, Armonk, NY, USA) and represented in plots using R 3.6.1116 (R Statistics, Vienna, Austria). A normality analysis was performed using the Shapiro–Wilk test. In all the experiments, a Kruskal–Wallis test with a Scheffe post hoc test was used to evaluate the differences between three groups. Significance was established at  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

In the present work, we characterized the permeability barrier with respect to its physiological, histopathological, and molecular changes in an immunocompetent mouse model of skin with CFC induced upon chronic UV-B irradiation. Although changes in skin with CFC included upregulation in differentiation markers and the lipid enzymes FA2H and ELOVL4, these were unable to restore the permeability barrier. This fact might be explained by permanent losses in stratum corneum integrity at the ultrastructural level (lamellar bilayers and lamellar body secretion), which are induced by UV-B irradiation. A higher pH on the skin surface and abundant mast cells in the dermis, which also affect the stratum corneum lipids, might contribute to a global detrimental effect on the permeability barrier despite the attempt of the reactive epidermis to restore both lipids and proteins in the upper epidermis. As current therapeutic approaches to AKs and CFC only focus on direct antineoplastic, immunomodulatory, or photodynamic effects of approved topical drugs, this mouse model of skin with CFC might be helpful for the identification and screening of potential new preventive strategies or treatments (e.g., skin barrier therapies).

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13163935/s1>, Figure S1: Uncropped original Western Blot.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.L.S. and E.M.G.-M.; methodology, J.L.S., E.M.G.-M. and J.M.P.-O.; software, M.A.d.I.C.-M., J.R.M.-R. and J.M.P.-O.; validation, C.V.-R., C.A., M.N.-C. and L.G.-L.; formal analysis, J.L.S., E.M.G.-M., C.V.-R., C.A., M.N.-C. and L.G.-L.; investigation, J.L.S., J.R.M.-R., M.A.d.I.C.-M., F.J.R.-C. and J.M.P.-O.; resources, F.J.R.-C., E.M.G.-M. and J.M.P.-O.; data curation, J.R.M.-R. and J.M.P.-O.; writing—original draft preparation, J.L.S., E.M.G.-M. and J.M.P.-O.; writing—review and editing, J.L.S., E.M.G.-M. and J.M.P.-O.; visualization, J.R.M.-R.; supervision, J.L.S. and E.M.G.-M.; project administration, J.M.P.-O.; funding acquisition, F.J.R.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** E.M.G.-M. was funded by the implementation research program of the UCLM, with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds), and currently holds a Distinguished Researcher contract from the same research program. J.R.M.-R., C.V.-R., and J.M.P.-O. were funded by the European Regional Development Fund (Castilla-La Mancha FEDER 2014-20 PO). M.A.d.k.C.-M. was funded by the Government of Castilla-La Mancha through “Convocatoria de Ayudas para la incorporacion de investigadores,” Ref. II-2016\_06.

**Institutional Review Board Statement:** This study was reviewed and approved by the Animal Care Committee of the University General Hospital of Ciudad Real (Ref. ES130340000192). Animals were handled and cared for in strict accordance with the European Council and Spanish Directives (2010/63/EU, RD 53/2013), under the supervision of authorized investigators.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

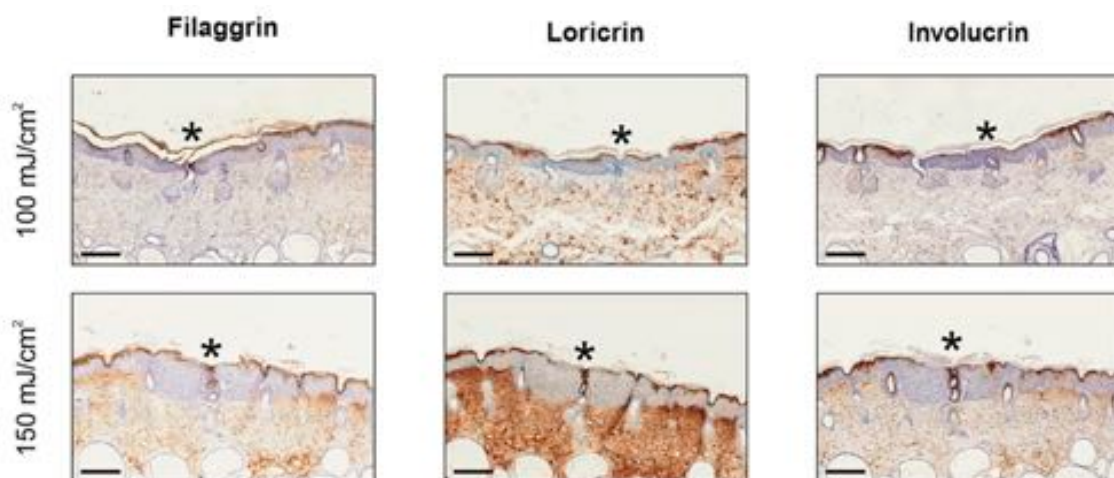
**Acknowledgments:** We would like to thank Amelia Gonzalez Lopez and Maria Jose Diaz Sanchez for their technical support (Translational Research Unit, Hospital General Universitario de Ciudad Real, Ciudad Real, Spain).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

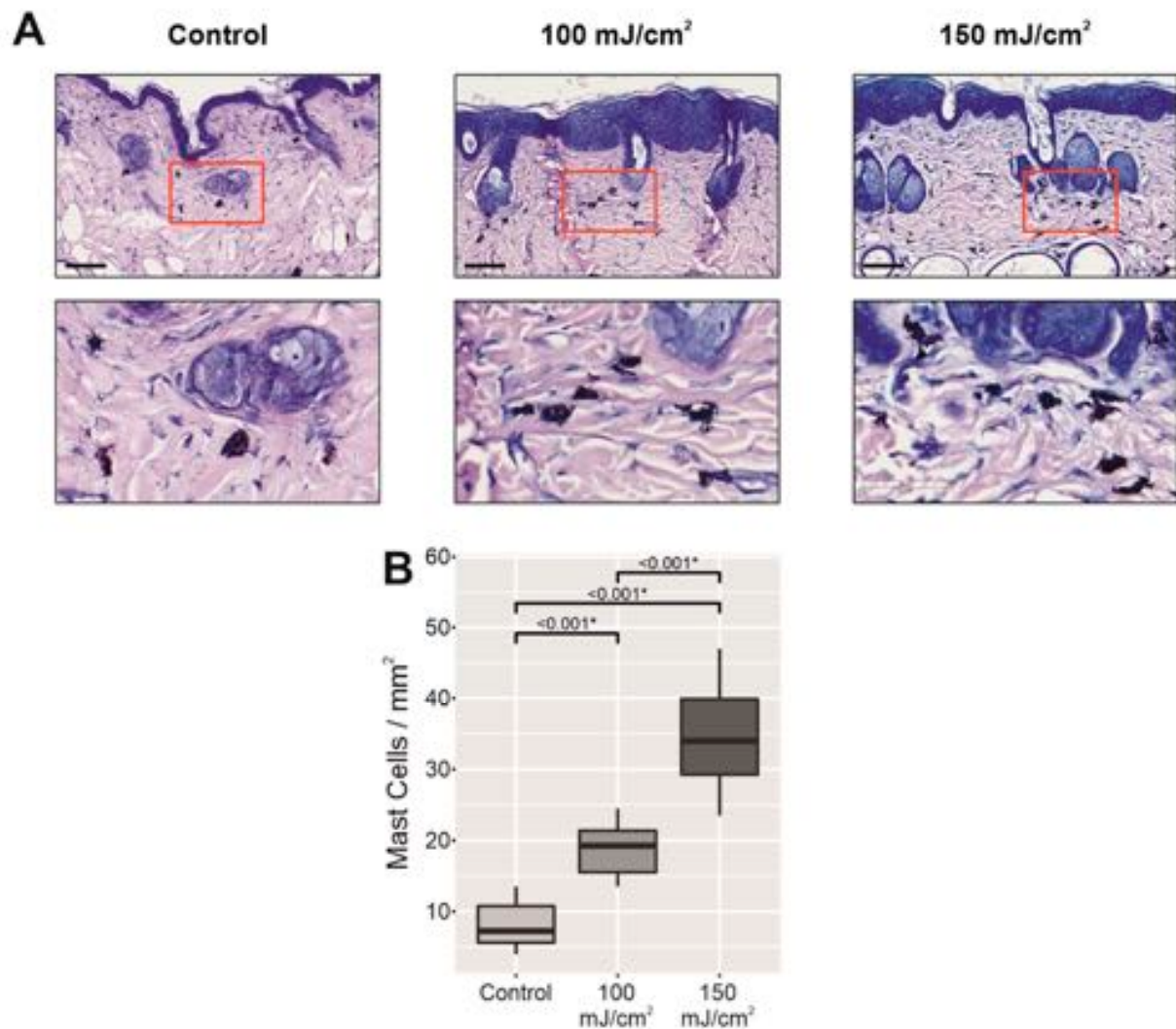
ABCA12	ATP-binding cassette subfamily A member 12
AK	Actinic keratosis
CFC	Cutaneous field cancerization
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELOVL4	Elongation of very long chain fatty acids protein 4
FA2H	Fatty acid 2-hydroxylase
HMGCoA reductase	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
mRNA	Messenger RNA
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP	p53 immunopositive patch
p53	Tumor suppressor p53
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SCC	Squamous cell carcinoma
SEM	Standard error of the mean
TEWL	Transepidermal water loss
UV-A light	Ultraviolet A light
UV-B light	Ultraviolet B light
WB	Western blotting

### Appendix A

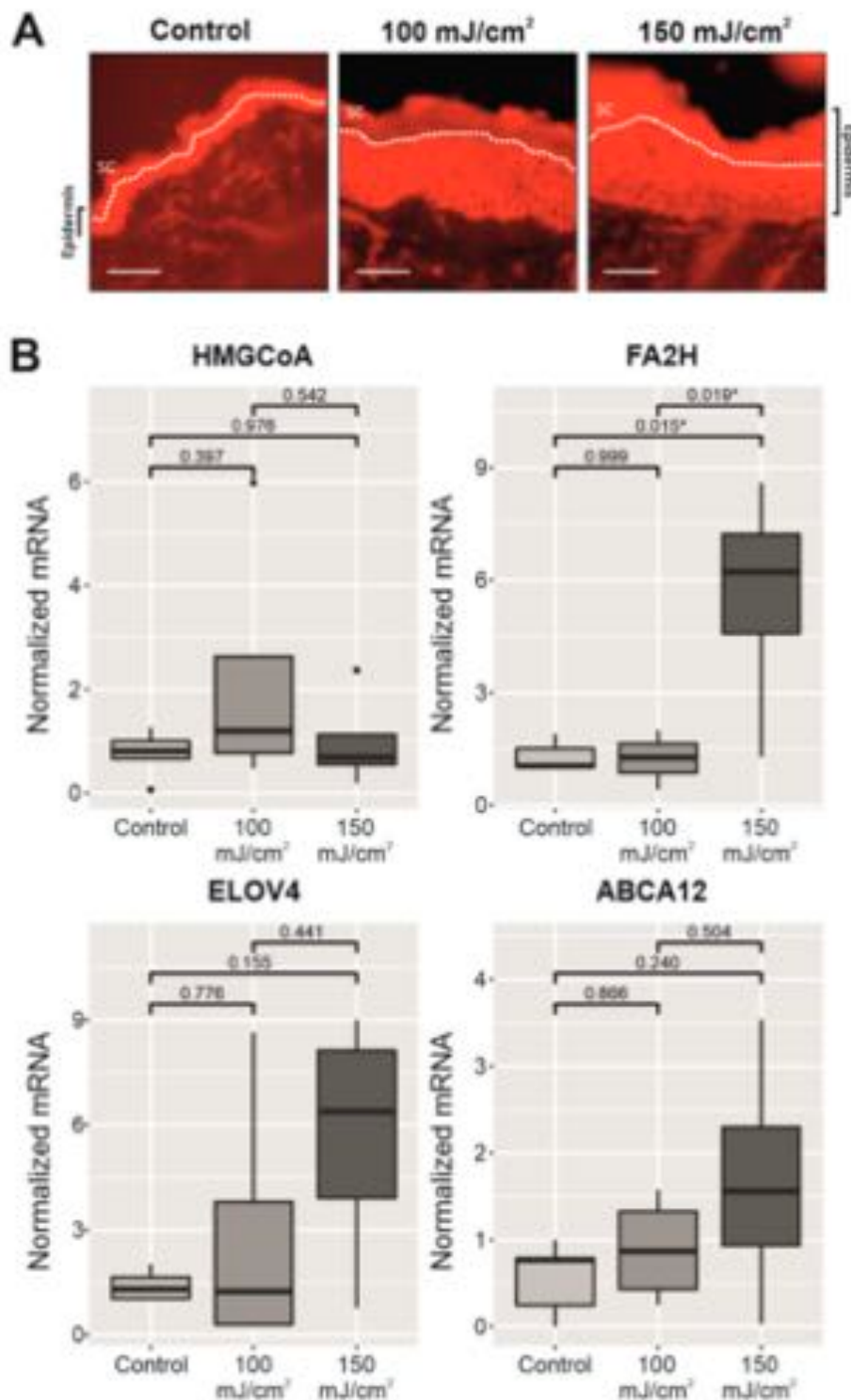


**Figure A1.** Immunostaining of incidental AKs (\*) surrounded by reactive epidermis in the skin of CFC. The upregulation of filaggrin, loricrin, and involucrin is observed in the reactive epidermis (upper layers) after chronic UV-B irradiation, while incidental AKs showed lower or null immunostaining for these differentiation markers. The scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ .





**Figure A2.** Giemsa staining to detect mast cell infiltrates in the dermis. In the bottom line, there is a zoomed-in view of the mast cells with their cytoplasm containing metachromatic granules composed of heparin and histamine. The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$  (A). Below, we give the quantities of mast cells in the UV-B-irradiated groups, 100 and 150  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , with respect to the nonirradiated group (B). Data are expressed as means  $\pm$  SD of at least 10 measurements of a number of mast cells in histological samples of skin with CFC in each group with UV-B irradiated skin with respect to the nonirradiated group. \*  $p$ -values are indicated in the figure and marked with an asterisk when significant,  $p < 0.05$  (Kruskal–Wallis test with Scheffe post hoc test).



**Figure A3.** Comparative Nile red staining of skin samples from nonirradiated skin with respect to the UV-B-irradiated skin with CFC of the mouse back at the end of the experiment (14 weeks after initiating UV-B irradiation), showing more fluorescent dye uptake within the epidermis and, especially, in the outermost layers of the epidermis. SC = stratum corneum. The scale bar represents 100 μm (A). Below, we give the mRNA expression levels of lipid enzymes HMGCoA reductase, FA2H, ELOVL4, and lipid transporter ABCA12, linked to the permeability barrier in UV-B-irradiated skin, 100 and 150 mJ/cm<sup>2</sup>, with respect to the nonirradiated group (B). Data are expressed as means ± SD of five experiments in each group. \* *p*-values are indicated in the figure and marked with an asterisk when significant, *p* < 0.05 (Kruskal–Wallis test with Scheffe post hoc test).



**Table A1.** Naked eye, dermoscopic, and histopathological features in the UV-B-irradiated groups compared to the nonirradiated group.

Group	<i>n</i>	Skin Appearance	Number of Macroscopic AKs/SCCs	Dermoscopy	Histopathology (Skin with CFC)
Control group	1	Aged mouse skin: thin pale skin with milia cysts.	None	Thin pale skin. Milia cysts.	Thin (normal) epidermis without keratinocyte atypia. Milia cysts in the dermis.
	2	Aged mouse skin: thin pale skin with milia cysts.	None	Thin pale skin. Milia cysts.	Thin (normal) epidermis without keratinocyte atypia. Milia cysts in the dermis.
	3	Aged mouse skin: thin pale skin with milia cysts.	None	Thin pale skin. Milia cysts.	Thin (normal) epidermis without keratinocyte atypia. Milia cysts in the dermis.
	4	Aged mouse skin: thin pale skin with milia cysts.	None	Thin pale skin. Milia cysts.	Thin (normal) epidermis without keratinocyte atypia. Milia cysts in the dermis.
	5	Aged mouse skin: thin pale skin with milia cysts.	None	Thin pale skin. Milia cysts.	Thin (normal) epidermis without keratinocyte atypia. Milia cysts in the dermis.
UV-B Irradiated Skin 100 mJ/cm <sup>2</sup>	1	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Few hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 5 N° SCCs: 0	AKs: Pink scaly structures without vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis with few patches of parakeratosis corresponding to microscopic AKs. Hypergranulosis. Keratinocyte atypia. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	2	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Few hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 3 N° SCCs: 2	AKs: Pink scaly structures without vessels. SCCs: Scaly crusted lesions with polymorphic vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis with few patches of microscopic AKs. Hypergranulosis. Keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in AKs. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	3	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Few hyperkeratotic lesions.	N° AKs: 5 N° SCCs: 0	AKs: Pink scaly structures without vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis with few patches of microscopic AKs and in situ SCC. Hypergranulosis. Keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in AKs or in situ SCC. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	4	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness.	N° AKs: 2 N° SCCs: 0	AKs: Pink scaly structures without vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis with few patches of microscopic AKs. Hypergranulosis. Keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in AKs. Mast cells in the dermis. Ectatic blood vessels in the dermis. Milia cysts in the dermis.

Table A1. Cont.

Group	n	Skin Appearance	Number of Macroscopic AKs/SCCs	Dermoscopy	Histopathology (Skin with CFC)
UV-B Irradiated Skin 150 mJ/cm <sup>2</sup>	5	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Few hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 9 N° SCCs: 4	AKs: Pink scaly structures without vessels. SCCs: Whitish structures with polymorphic vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis with few patches of microscopic AKs. Hypergranulosis. Keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in some of the AKs. Ectatic blood vessels in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	1	Thicker scaly erythematous skin. Cutaneous dryness. Hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 2 N° SCCs: 6	AKs: Pink scaly structures without vessels. SCCs: Verrucous hyperkeratotic lesions, central crust, and atypical vessels. Polypoid whitish lesions with polymorphic vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis. Hypergranulosis. Microscopic AKs (more common). Marked keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in some of the AKs. Ectatic blood vessels in the dermis. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	2	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Few hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 3 N° SCCs: 3	AKs: Pink scaly structures without vessels. SCCs: Crusted and whitish structures with polymorphic vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis. Hypergranulosis. Microscopic AKs (more common) and in situ SCC. Marked keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in some of the AKs. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	3	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness. Hyperkeratotic verrucous lesions.	N° AKs: 5 N° SCCs: 6	AKs: Pink scaly structures without vessels. SCCs: Hyperkeratotic whitish structures, central crust, and looped vessels. Polypoid whitish lesions with polymorphic vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis. Hypergranulosis. Microscopic AKs. Keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in AKs. Mast cells in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	4	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness.	N° AKs: 3 N° SCCs: 0	AKs: Pink scaly structures without vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis. Hypergranulosis. Microscopic AKs. Marked keratinocyte atypia. Few inflammatory infiltrates in AKs. Mast cells in the dermis. Ectatic blood vessels in the dermis. Milia cysts in the dermis.
	5	Thicker erythematous scaly skin. Cutaneous dryness.	N° AKs: 2 N° SCCs: 0	AKs: Pink scaly structures without vessels.	Orthokeratotic hyperplasia of the epidermis. Hypergranulosis. Microscopic AKs and in situ SCC. Marked keratinocyte atypia. Mast cells in the dermis. Ectatic blood vessels in the dermis. Milia cysts in the dermis.

Table A2. Primers for qRT-PCR.

Gene	Forward Primer (5′–3′)	Reverse Primer (5′–3′)
18S RNA	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGTAGCG
mFilaggrin	ATGTCCGCTCTCCTGGAAAG	TGGATTCTTCAAGACTGCCTGTA
mLoricrin	GTGGAAAGACCTCTGGTGG	TGGAACCACCTCCATAGGAA
mInvolucrin	AAGGGCTTCCCAAACATGA	TGCTGGTGCTCACACTTTTGA
mHMGCoA reductase	CTTGTGGAATGCCTTGTGAT	CCGAAGCAGCACATGATC
mFA2H	CGCTGGCTGGAGCAGTACTAT	TGCAGAGGCTACAGCACCATT
mELOVL4	CGATAAGCATAAGCAGCTCTATC	AACGGCTCGCGGTCTTTC
mABCA12	AGGATGGCTTCCCAGTTTCA	TGGCCATAAGATCAAGACAAGTGT

## References

- Haywood, R.; Rogge, F.; Lee, M. Protein, Lipid, and DNA Radicals to Measure Skin UVA Damage and Modulation by Melanin. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 990–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jinnestål, C.L.; Belfrange, E.; Bäck, O.; Schmidtchen, A.; Sonesson, A. Skin Barrier Impairment Correlates with Cutaneous Staphylococcus Aureus Colonization and Sensitization to Skin-Associated Microbial Antigens in Adult Patients with Atopic Dermatitis. *Int. J. Dermatol.* **2014**, *53*, 27–33. [[CrossRef](#)]
- Kim, B.E.; Kim, J.; Goleva, E.; Berdyshev, E.; Lee, J.; Vang, K.A.; Lee, U.H.; Han, S.; Leung, S.; Hall, C.F.; et al. Particulate Matter Causes Skin Barrier Dysfunction. *JCI Insight* **2021**, *6*, 145185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jakasa, I.; Thyssen, J.P.; Kezic, S. The Role of Skin Barrier in Occupational Contact Dermatitis. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 909–914. [[CrossRef](#)]
- Pigors, M.; Kiritsi, D.; Cobzaru, C.; Schwieger-Briel, A.; Suárez, J.; Faletra, F.; Aho, H.; Mäkelä, L.; Kern, J.S.; Bruckner-Tuderman, L.; et al. TGM5 Mutations Impact Epidermal Differentiation in Acral Peeling Skin Syndrome. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2422–2429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.-M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 1063–1072. [[CrossRef](#)]
- Feingold, K.R.; Elias, P.M. Role of Lipids in the Formation and Maintenance of the Cutaneous Permeability Barrier. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 280–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmuth, M.; Blunder, S.; Dubrac, S.; Gruber, R.; Moosbrugger-Martinez, V. Epidermal Barrier in Hereditary Ichthyoses, Atopic Dermatitis, and Psoriasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2015**, *13*, 1119–1123. [[CrossRef](#)]
- Nemes, Z.; Steinert, P.M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Exp. Mol. Med.* **1999**, *31*, 5–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Choi, E.-H.; Man, M.-Q.; Xu, P.; Xin, S.; Liu, Z.; Crumrine, D.A.; Jiang, Y.J.; Fluhr, J.W.; Feingold, K.R.; Elias, P.M.; et al. Stratum Corneum Acidification Is Impaired in Moderately Aged Human and Murine Skin. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 2847–2856. [[CrossRef](#)]
- Ichihashi, M.; Ueda, M.; Budiyanto, A.; Bito, T.; Oka, M.; Fukunaga, M.; Tsuru, K.; Horikawa, T. UV-Induced Skin Damage. *Toxicology* **2003**, *189*, 21–39. [[CrossRef](#)]
- Ratushny, V.; Gober, M.D.; Hick, R.; Ridky, T.W.; Seykora, J.T. From Keratinocyte to Cancer: The Pathogenesis and Modeling of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 464–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramos-e-Silva, M.; Boza, J.C.; Cestari, T.F. Effects of Age (Neonates and Elderly) on Skin Barrier Function. *Clin. Dermatol.* **2012**, *30*, 274–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Biniak, K.; Levi, K.; Dauskardt, R.H. Solar UV Radiation Reduces the Barrier Function of Human Skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17111–17116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Permatasari, F.; Zhou, B.; Luo, D. Epidermal Barrier: Adverse and Beneficial Changes Induced by Ultraviolet B Irradiation Depending on the Exposure Dose and Time (Review). *Exp. Ther. Med.* **2013**, *6*, 287–292. [[CrossRef](#)]
- Fernandez Figueras, M.T. From Actinic Keratosis to Squamous Cell Carcinoma: Pathophysiology Revisited. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31* (Suppl. 2), 5–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmitz, L.; Oster-Schmidt, C.; Stockfleth, E. Nonmelanoma Skin Cancer—From Actinic Keratosis to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2018**, *16*, 1002–1013. [[CrossRef](#)]
- Ulrich, M.; Maltusch, A.; Röwert-Huber, J.; González, S.; Sterry, W.; Stockfleth, E.; Astner, S. Actinic Keratoses: Non-Invasive Diagnosis for Field Cancerisation. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *156* (Suppl. 3), 13–17. [[CrossRef](#)]
- Friis, K.B.E.; Themstrup, L.; Jemec, G.B.E. Optical Coherence Tomography in the Diagnosis of Actinic Keratosis—A Systematic Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *18*, 98–104. [[CrossRef](#)]
- Tyrrell, J.; Campbell, S.M.; Curnow, A. Monitoring the Accumulation and Dissipation of the Photosensitizer Protoporphyrin IX during Standard Dermatological Methyl-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy Utilizing Non-Invasive Fluorescence Imaging and Quantification. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2011**, *8*, 30–38. [[CrossRef](#)]

21. Jonason, A.S.; Kunal, S.; Price, G.J.; Restifo, R.J.; Spinelli, H.M.; Persing, J.A.; Leffell, D.J.; Tarone, R.E.; Brash, D.E. Frequent Clones of P53-Mutated Keratinocytes in Normal Human Skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14025–14029. [[CrossRef](#)]
22. Kramata, P.; Lu, Y.-P.; Lou, Y.-R.; Singh, R.N.; Kwon, S.M.; Conney, A.H. Patches of Mutant P53-Immunoreactive Epidermal Cells Induced by Chronic UVB Irradiation Harbor the Same P53 Mutations as Squamous Cell Carcinomas in the Skin of Hairless SKH-1 Mice. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3577–3585. [[CrossRef](#)]
23. Robinson, S.; Dixon, S.; August, S.; Diffey, B.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Friedmann, P.S.; Healy, E. Protection against UVR Involves MC1R-Mediated Non-Pigmentary and Pigmentary Mechanisms in Vivo. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 1904–1913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rebel, H.; Kram, N.; Westerman, A.; Banus, S.; van Kranen, H.J.; de Gruij, F.R. Relationship between UV-Induced Mutant P53 Patches and Skin Tumours, Analysed by Mutation Spectra and by Induction Kinetics in Various DNA-Repair-Deficient Mice. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 2123–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Holleran, W.M.; Uchida, Y.; Halkier-Sorensen, L.; Haratake, A.; Hara, M.; Epstein, J.H.; Elias, P.M. Structural and Biochemical Basis for the UVB-Induced Alterations in Epidermal Barrier Function. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1997**, *13*, 117–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Meguro, S.; Arai, Y.; Masukawa, Y.; Uie, K.; Tokimitsu, I. Relationship between Covalently Bound Ceramides and Transepidermal Water Loss (TEWL). *Arch. Dermatol. Res.* **2000**, *292*, 463–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Takagi, Y.; Nakagawa, H.; Kondo, H.; Takema, Y.; Imokawa, G. Decreased Levels of Covalently Bound Ceramide Are Associated with Ultraviolet B-Induced Perturbation of the Skin Barrier. *J. Investig. Dermatol.* **2004**, *123*, 1102–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jiang, S.J.; Chu, A.W.; Lu, Z.F.; Pan, M.H.; Che, D.F.; Zhou, X.J. Ultraviolet B-Induced Alterations of the Skin Barrier and Epidermal Calcium Gradient. *Exp. Dermatol.* **2007**, *16*, 985–992. [[CrossRef](#)]
29. Schaffer, B.S.; Grayson, M.H.; Wortham, J.M.; Kubicek, C.B.; McCleish, A.T.; Prajapati, S.I.; Nelson, L.D.; Brady, M.M.; Jung, I.; Hosoyama, T.; et al. Immune Competency of a Hairless Mouse Strain for Improved Preclinical Studies in Genetically Engineered Mice. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2354–2364. [[CrossRef](#)]
30. Pillon, A.; Gomes, B.; Vandenberghe, I.; Cartron, V.; Cèbe, P.; Blanchet, J.-C.; Sibaud, V.; Guilbaud, N.; Audoly, L.; Lamant, L.; et al. Actinic Keratosis Modelling in Mice: A Translational Study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179991. [[CrossRef](#)]
31. Cozzi, S.-J.; Ogbourne, S.M.; James, C.; Rebel, H.G.; de Gruij, F.R.; Ferguson, B.; Gardner, J.; Lee, T.T.; Larcher, T.; Suhrbier, A. Ingenol Mebutate Field-Directed Treatment of UVB-Damaged Skin Reduces Lesion Formation and Removes Mutant P53 Patches. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 1263–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Divya, S.P.; Wang, X.; Pratheeshkumar, P.; Son, Y.-O.; Roy, R.V.; Kim, D.; Dai, J.; Hitron, J.A.; Wang, L.; Asha, P.; et al. Blackberry Extract Inhibits UVB-Induced Oxidative Damage and Inflammation through MAP Kinases and NF-KB Signaling Pathways in SKH-1 Mice Skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *284*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huang, K.M.; Liang, S.; Yeung, S.; Oiyemhonlan, E.; Cleveland, K.H.; Parsa, C.; Orlando, R.; Meyskens, F.L.; Andresen, B.T.; Huang, Y. Topically Applied Carvedilol Attenuates Solar Ultraviolet Radiation Induced Skin Carcinogenesis. *Cancer Prev. Res.* **2017**, *10*, 598–606. [[CrossRef](#)]
34. Tan, J.M.; Lambie, D.; Sinnya, S.; Sahebian, A.; Soyer, H.P.; Prow, T.W.; Ardigò, M. Histopathology and Reflectance Confocal Microscopy Features of Photodamaged Skin and Actinic Keratosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2016**, *30*, 1901–1911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Persechino, F.; Ranieri, D.; Guttieri, L.; Nanni, M.; Torrisi, M.R.; Belleudi, F. Expression Profile of Fibroblast Growth Factor Receptors, Keratinocyte Differentiation Markers, and Epithelial Mesenchymal Transition-Related Genes in Actinic Keratosis: A Possible Predictive Factor for Malignant Progression? *Biology* **2021**, *10*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bak, H.; Hong, S.-P.; Jeong, S.-K.; Choi, E.-H.; Lee, S.E.; Lee, S.-H.; Ahn, S.-K. Altered Epidermal Lipid Layers Induced by Long-Term Exposure to Suberythemal-Dose Ultraviolet. *Int. J. Dermatol.* **2011**, *50*, 832–837. [[CrossRef](#)]
37. Del Bino, S.; Vioux, C.; Rossio-Pasquier, P.; Jomard, A.; Demarchez, M.; Asselineau, D.; Bernerd, F. Ultraviolet B Induces Hyperproliferation and Modification of Epidermal Differentiation in Normal Human Skin Grafted on to Nude Mice. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *150*, 658–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hong, S.P.; Kim, M.J.; Jung, M.-Y.; Jeon, H.; Goo, J.; Ahn, S.K.; Lee, S.H.; Elias, P.M.; Choi, E.H. Biopositive Effects of Low-Dose UVB on Epidermis: Coordinate Upregulation of Antimicrobial Peptides and Permeability Barrier Reinforcement. *J. Investig. Dermatol.* **2008**, *128*, 2880–2887. [[CrossRef](#)]
39. Lee, J.H.; An, H.T.; Chung, J.H.; Kim, K.H.; Eun, H.C.; Cho, K.H. Acute Effects of UVB Radiation on the Proliferation and Differentiation of Keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2002**, *18*, 253–261. [[CrossRef](#)]
40. Kambayashi, H.; Yamashita, M.; Otake, Y.; Takada, K.; Funasaka, Y.; Ichihashi, M. Epidermal Changes Caused by Chronic Low-Dose UV Irradiation Induce Wrinkle Formation in Hairless Mouse. *J. Dermatol. Sci.* **2001**, *27* (Suppl. 1), S19–S25. [[CrossRef](#)]
41. Kambayashi, H.; Otake, Y.; Takada, K.; Funasaka, Y.; Ichihashi, M. Involvement of Changes in Stratum Corneum Keratin in Wrinkle Formation by Chronic Ultraviolet Irradiation in Hairless Mice. *Exp. Dermatol.* **2003**, *12* (Suppl. 2), 22–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dalmau, N.; Andrieu-Abadie, N.; Tauler, R.; Bedia, C. Phenotypic and Lipidomic Characterization of Primary Human Epidermal Keratinocytes Exposed to Simulated Solar UV Radiation. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *92*, 97–105. [[CrossRef](#)]

43. Löwenau, L.J.; Zoschke, C.; Brodewolf, R.; Volz, P.; Hausmann, C.; Wattanapitayakul, S.; Boreham, A.; Alexiev, U.; Schäfer-Korting, M. Increased Permeability of Reconstructed Human Epidermis from UVB-Irradiated Keratinocytes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 149–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tsakok, T.; Woolf, R.; Smith, C.H.; Weidinger, S.; Flohr, C. Atopic Dermatitis: The Skin Barrier and Beyond. *Br. J. Dermatol.* **2019**, *180*, 464–474. [[CrossRef](#)]
45. Lin, T.-K.; Crumrine, D.; Ackerman, L.D.; Santiago, J.-L.; Roelandt, T.; Uchida, Y.; Hupe, M.; Fabriàs, G.; Abad, J.L.; Rice, R.H.; et al. Cellular Changes That Accompany Shedding of Human Corneocytes. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2430–2439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mauro, T.; Holleran, W.M.; Grayson, S.; Gao, W.N.; Man, M.Q.; Kriehuber, E.; Behne, M.; Feingold, K.R.; Elias, P.M. Barrier Recovery Is Impeded at Neutral PH, Independent of Ionic Effects: Implications for Extracellular Lipid Processing. *Arch. Dermatol. Res.* **1998**, *290*, 215–222. [[CrossRef](#)]
47. Hachem, J.-P.; Roelandt, T.; Schürer, N.; Pu, X.; Fluhr, J.; Giddelo, C.; Man, M.-Q.; Crumrine, D.; Roseeuw, D.; Feingold, K.R.; et al. Acute Acidification of Stratum Corneum Membrane Domains Using Polyhydroxyl Acids Improves Lipid Processing and Inhibits Degradation of Corneodesmosomes. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 500–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hachem, J.-P.; Crumrine, D.; Fluhr, J.; Brown, B.E.; Feingold, K.R.; Elias, P.M. PH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J. Investig. Dermatol.* **2003**, *121*, 345–353. [[CrossRef](#)]
49. Yamamoto, T.; Kurasawa, M.; Hattori, T.; Maeda, T.; Nakano, H.; Sasaki, H. Relationship between Expression of Tight Junction-Related Molecules and Perturbed Epidermal Barrier Function in UVB-Irradiated Hairless Mice. *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 61–68. [[CrossRef](#)]
50. Kligman, L.H.; Murphy, G.F. Ultraviolet B Radiation Increases Hairless Mouse Mast Cells in a Dose-Dependent Manner and Alters Distribution of UV-Induced Mast Cell Growth Factor. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 123–127. [[CrossRef](#)]
51. Bosset, S.; Bonnet-Duquennoy, M.; Barré, P.; Chalon, A.; Kurfurst, R.; Bonté, F.; Schnébert, S.; Le Varlet, B.; Nicolas, J.F. Photoageing Shows Histological Features of Chronic Skin Inflammation without Clinical and Molecular Abnormalities. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 826–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Coussens, L.M.; Raymond, W.W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Caughey, G.H.; Hanahan, D. Inflammatory Mast Cells Up-Regulate Angiogenesis during Squamous Epithelial Carcinogenesis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1382–1397. [[CrossRef](#)]
53. Andreu, P.; Johansson, M.; Affara, N.I.; Pucci, F.; Tan, T.; Junankar, S.; Korets, L.; Lam, J.; Tawfik, D.; DeNardo, D.G.; et al. FcRgamma Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 121–134. [[CrossRef](#)]
54. Chacón-Salinas, R.; Limón-Flores, A.Y.; Chávez-Blanco, A.D.; Gonzalez-Estrada, A.; Ullrich, S.E. Mast Cell-Derived IL-10 Suppresses Germinal Center Formation by Affecting T Follicular Helper Cell Function. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 25–31. [[CrossRef](#)]
55. Ashida, Y.; Denda, M.; Hirao, T. Histamine H1 and H2 Receptor Antagonists Accelerate Skin Barrier Repair and Prevent Epidermal Hyperplasia Induced by Barrier Disruption in a Dry Environment. *J. Investig. Dermatol.* **2001**, *116*, 261–265. [[CrossRef](#)]
56. Albibas, A.A.; Rose-Zerilli, M.J.J.; Lai, C.; Pengelly, R.J.; Lockett, G.A.; Theaker, J.; Ennis, S.; Holloway, J.W.; Healy, E. Subclonal Evolution of Cancer-Related Gene Mutations in P53 Immunopositive Patches in Human Skin. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 189–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Haratake, A.; Uchida, Y.; Schmuth, M.; Tanno, O.; Yasuda, R.; Epstein, J.H.; Elias, P.M.; Holleran, W.M. UVB-Induced Alterations in Permeability Barrier Function: Roles for Epidermal Hyperproliferation and Thymocyte-Mediated Response. *J. Investig. Dermatol.* **1997**, *108*, 769–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Liou, A.; Elias, P.M.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R.; Wood, L.C. Amphiregulin and Nerve Growth Factor Expression Are Regulated by Barrier Status in Murine Epidermis. *J. Investig. Dermatol.* **1997**, *108*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Darido, C.; Georgy, S.R.; Jane, S.M. The Role of Barrier Genes in Epidermal Malignancy. *Oncogene* **2016**, *35*, 5705–5712. [[CrossRef](#)]
60. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]

RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of transcriptionally regulated genes identifies NCOR1 in hormone receptor negative breast tumors and lung adenocarcinomas as a potential tumor suppressor gene

María del Mar Noblejas-López<sup>1,2</sup>✉, Sara Morcillo-García<sup>1,2</sup>✉, Cristina Nieto-Jiménez<sup>1,2</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1,2</sup>, Balázs Györfy<sup>3,4</sup>, Eva M. Galan-Moya<sup>1,2\*</sup>, Atanasio Pandiella<sup>5</sup>, Alberto Ocaña<sup>1,2\*</sup>

**1** Translational Research Unit, Albacete University Hospital, and CIBERONC, Albacete, Spain, **2** Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain, **3** Semmelweis University 2nd Dept. of Pediatrics, Budapest, Hungary, **4** MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Institute of Enzymology, Budapest, Hungary, **5** Cancer Research Center, CSIC-IBSAL and CIBERONC, Salamanca, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [albertoo@sescam.jccm.es](mailto:albertoo@sescam.jccm.es) (AO); [EvaMaria.Galan@uclm.es](mailto:EvaMaria.Galan@uclm.es) (EMGM)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Noblejas-López MdM, Morcillo-García S, Nieto-Jiménez C, Nuncia-Cantarero M, Györfy B, Galan-Moya EM, et al. (2018) Evaluation of transcriptionally regulated genes identifies NCOR1 in hormone receptor negative breast tumors and lung adenocarcinomas as a potential tumor suppressor gene. PLoS ONE 13(11): e0207776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776>

**Editor:** Irina U. Agoulnik, Florida International University, UNITED STATES

**Received:** June 3, 2018

**Accepted:** November 6, 2018

**Published:** November 28, 2018

**Copyright:** © 2018 Noblejas-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121 to AO), Diputación de Albacete and CIBERONC (to AO); and CRIS Cancer Foundation (to AO and AP). We would like to also thank the cancer association ACEPAIN for supporting part of this work. EMGM is funded by

## Abstract

Regulation of transcription is a key process in cellular homeostasis. It depends on regulators that either repress or stimulate the transcription of genes, therefore controlling different biological functions. The Nuclear Receptor Corepressor 1 (NCOR1) is one of those co-repressors that regulate the transcription by facilitating the recruitment of HDAC1, 2, 3, 4, 5 and 7. In our article, by using an *in silico* approach, we evaluate the mutational status of NCOR1 in breast and lung tumors. We identified that NCOR1 is mutated in more than 3% of breast tumors and lung adenocarcinomas and linked this fact with detrimental outcome in some subtypes, particularly in those that are hormone receptor negative. In addition to these findings, as mutations in this gene are deleterious, we confirmed that high levels of this gene were linked with good prognosis in the same tumor subtypes. Findings in the same direction were identified in lung adenocarcinomas, with mutations associated with detrimental prognosis and high expression with better outcome. In conclusion, hereby we describe the presence and prognostic role of mutations in the NCOR1 gene in hormone receptor negative breast and lung adenocarcinomas, and we also confirm that NCOR1 is a tumor suppressor gene. Further studies should be performed to explore therapeutic mechanisms to restore its function.



the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds).

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Regulation of transcription is a key process in cellular homeostasis [1, 2]. It depends on regulators that either repress or stimulate the transcription of genes, therefore controlling different biological functions [1, 2]. In this context, modifications of the transcription process have been associated with human disorders, such as neurological or inflammatory diseases or cancer, among others [1, 2].

Activation of transcription is regulated at different levels, and epigenetic mechanisms play a central role [1, 3]. Notably, epigenetic modifications on histones can impact on the transcription of different genes, and its deregulation has been involved in the initiation and progression of tumors [1].

Acetylation of histones is mediated by enzymes like histone acetyltransferases and deacetylase (HDAC), that can modify the conformation of the chromatin and therefore affect the transcriptional activity [2].

The function of these enzymes depends, in many occasions, on the presence of co-repressors, which can facilitate or repress the transcription of several genes [4]. The Nuclear Receptor Corepressor 1 (NCOR1) is one of those co-repressors that regulates the transcription by facilitating the recruitment of HDAC1, 2, 3, 4, 5 and 7 [5]. Among all, HDAC3 is probably the principal responsible of its activity, as the catalytic activity of this enzyme requires interaction with NCOR [3, 6].

NCOR1 plays a central role in human biology, being involved in many process including lipid metabolisms, cell fate, glucose homeostasis or neural stem cells [5]. Indeed, germline mutations of NCOR produce embryonic lethality [7]. NCOR1 has also been involved in cancer [5, 8, 9]. Mutations or deletions of this gene have been described in several solid tumors, such as colorectal cancer, bladder cancer or hepatocarcinomas [5, 8, 9]. Indeed, it has been considered as a tumor suppressor gene as reduced levels of the gene promote tumor proliferation and invasion [5].

In our article, we evaluate the mutational status of NCOR1 in breast and lung tumors, focusing on genes involved in transcriptional regulation. We identified that NCOR1 is mutated in more than 3% of breast tumors and lung adenocarcinomas and linked with detrimental outcome in some subtypes. In addition to these findings, as mutations at this gene are deleterious, we confirmed that high levels of this gene were linked with good prognosis in those tumor types.

## Material and methods

### Identification of high-frequency mutated genes

Breast Cancer METABRIC database, contained in cBioportal (<http://www.cbioportal.org>), includes genomic information from 2509 breast cancer samples [10]. Then, we selected the 772 samples from patients diagnosed with Invasive Breast Carcinoma (S1 Table). We studied the gene mutation profile and selected those genes presented in more than 2% of the patients. The frequency of mutation was independently confirmed for all the four different breast cancer subtypes using TCGA database (n = 818).

NCOR1 frequency of mutation in lung adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma (n = 230 and n = 178, respectively) was extracted from TCGA database contained at cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>).

### Functional analysis

The selected mutated genes were analyzed using the biological functional enrichment analyses tool Enrichr (<http://www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). An adjusted *p*-value <0.05 was

used to select the enriched gene-sets. This tool was also used to evaluate genes present in the mutated NCOR1 signature.

### Outcome analyses

The genotype-2-Outcome online tool (<http://www.g-2-o.com>) was used to evaluate the relationship between the presence of mutated NCOR1 and patient clinical outcome through the development of a NCOR1 expression signature associated with all NCOR1 mutations [11]. This includes not only patients with NCOR1 mutation, but all patients who have a gene expression signature similar to those with an NCOR1 mutation. This publicly available database allowed assessment of clinical outcome (overall survival (OS)) for all the four breast cancer subtypes (All, Triple Negative Breast Cancer, Luminal A, Luminal B and HER2+) and (relapse free survival (RFS)) for lung adenocarcinomas. In the analysis, the expression of genes related to NCOR1 mutation was computed for each sample. Then, the upper quartile (25% with higher expression) or the median across all patients was used to define two cohorts, and each patient was assigned to those with higher expression or to those with lower expression, based on the threshold defined for the upper quartile or the median value. The two cohorts were compared using a Cox regression analysis.

KM Plotter Online Tool (<http://www.kmplot.com>) was used to investigate the relationship between the NCOR1 expression and patient clinical outcome. This database allowed assessment of overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) for all subtypes, basal-like, luminal A, luminal B, HER2+ and lung adenocarcinoma.

Patients were separated according to upper quartile or best cutoff values. For the latter, all possible cutoff values between the lower and the upper quartiles are analyzed, and the one with the lowest p value was used as a cutoff to separate the two patient cohorts. Patients above the threshold were considered to have a “high” expression while patients below the threshold were defined as those with “low” expression.

### Evaluation of NCOR1 mutations

The information contained at cBioportal (<http://www.cbioportal.org>) was used to identify NCOR1 mutations. The effect of each mutation on NCOR1 activity was investigated in SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) databases.

### Assessment of NCOR1 association with therapy

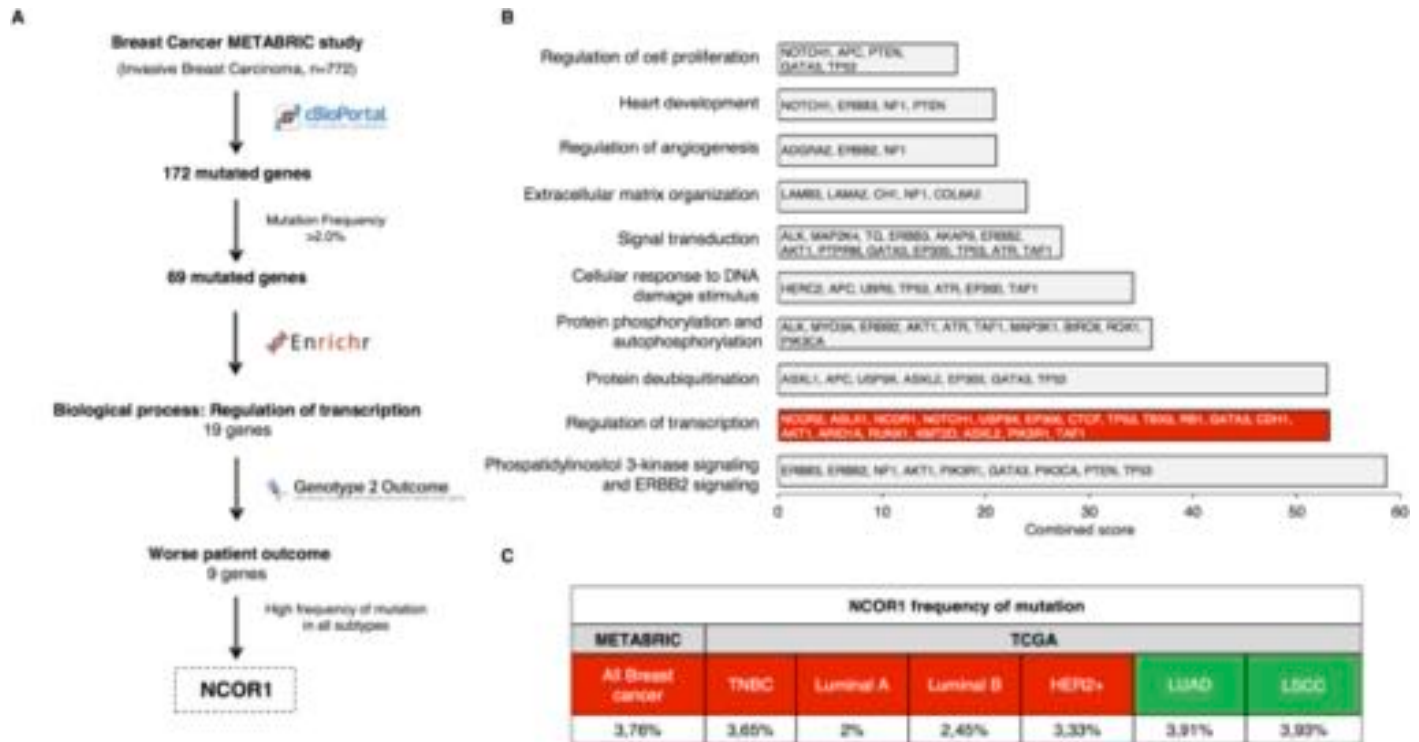
We have searched GEO to identify breast cancer transcriptomic datasets with published treatment and follow-up data as described previously [12, 13] to link gene expression levels to patient’s response to the received therapy (Chemotherapy, Endocrine-therapy and Anti-HER2 therapy). Response was determined using relapse-free survival at five years: patients with a relapse before five years were designated as non-responders, those without a relapse before five years were designated as responders. Patients censored before five years follow-up were excluded from the analysis. We performed Mann-Whitney analysis comparing responder and non-responder patients in order to study the association of NCOR1 with therapy response. Molecular subtypes were determined as described previously [14].

## Results

### Identification of mutations in transcriptional-regulated genes

We used public information from the METABRIC study (n = 772) to study genes mutated in breast cancer patients (Fig 1A). We found a total of 172 altered genes, of which 69 were





**Fig 1. Whole genome mutation profiling and identification of regulation of transcription as an altered function in breast cancer.** A. Flow chart of the study. B. Functional analyses of the selected 69 mutated genes (Mutation frequency > 2.0%). C. NCOR1 frequency of mutation for the overall of the breast cancer cases (All Breast Cancer), according to METABRIC (n = 2059), was confronted with data from the TCGA database (n = 818), which allows the estimation of the frequency of mutation for each breast cancer subtype individually. This database was also used to extract the frequency of NCOR1 mutations in Lung Adenocarcinoma (LUAD) (n = 230) and Lung Squamous Cells Carcinoma (LSCC) patients (n = 178).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776.g001>

mutated in more than 2% of the patients. Next, we investigated their function using gene set enrichment analyses and we focused on those involved in the regulation of transcription (Fig 1B). In addition, taking advantage of the online tool “genome 2 outcome”, which links gene mutations with a transcriptomic signature associated with that mutation, we selected those genes that predicted detrimental prognosis. With this approach, we found 9 mutated genes associated with worse patient outcome (Fig 1A and S2 Table). Some of these genes have been deeply explored in breast cancer, like TP53, RB1 or PiK3R1. However, others have been less studied, like TAF1, KTM2D, RUNX1, EP300 or NCOR1 and NCOR2. We put our attention on NCOR1, as it was the only one associated with detrimental outcome in a significant manner in all breast cancer subtypes. Besides, little is known about its role in hormone receptor-negative breast tumors. Data obtained from the METABRIC study was corroborated with data extracted from the TCGA database. As shown, NCOR1 was mutated in 3.76% of all breast tumors, and in 3.65% of basal-like, 2% of Luminal A, 2.45% of Luminal B, and 3.33% of HER2 positive (Fig 1C).

### Presence of NCOR1 mutations predict detrimental prognosis in triple negative, HER2 positive and luminal B tumors

Using the NCOR1 mutational-transcriptomic signature as a read out of the mutation, we explored the association of this signature with prognosis, overall survival (OS) specifically. Mutations at NCOR1 were associated with detrimental outcome in all breast tumors (HR:0.63, CI: 0.56–0.7; log rank p = 0), luminal B (HR:0.65, CI: 0.54–0.79; log rank p = 1.2e-05), basal

(HR:0.58, CI: 0.45–0.76; log rank  $p = 3.3e-05$ ) and HER2 positive tumors (HR:0.62, CI: 0.43–0.90; log rank  $p = 0.012$ ) (Fig 2A, 2B, 2C and 2D, respectively). The low prevalence of mutations in the luminal A subtype limited the analyses between mutation and clinical outcome in this subtype.

### Functional analysis of the NCOR1 mutational-transcriptomic signature

Next, we explored which genes were included in the NCOR1 mutational signature and their biological function. Genes down-regulated in NCOR1-mutated tumors include those involved in lipid storage like DGAT2 and CD36, or cell surface receptor signaling including genes like OXTR, SEMA6A or TNFRF25. Up-regulated genes comprised CXCL10, CYBB, SLC16A6 or HNF4G (Fig 3A).

### NCOR1 mutations and loss of function

As mutations of this gene have an impact on patient outcome, we aimed to analyze the biological role of these mutations on the expression of the protein and its function. To do so, we used the cancer genomics database cBioportal to identify *NCOR1* mutations in each METABRIC patient (Fig 3B). Missense and truncating mutations were the most frequent mutations identified with only one case of inframe mutations (Fig 3C). The functional impact of all these different mutations, evaluated with two different databases (SIFT and PolyPhen-2), is displayed in Fig 3D. As shown, most NCOR1 mutations are deleterious or damaging, therefore affecting the functional role of the protein.

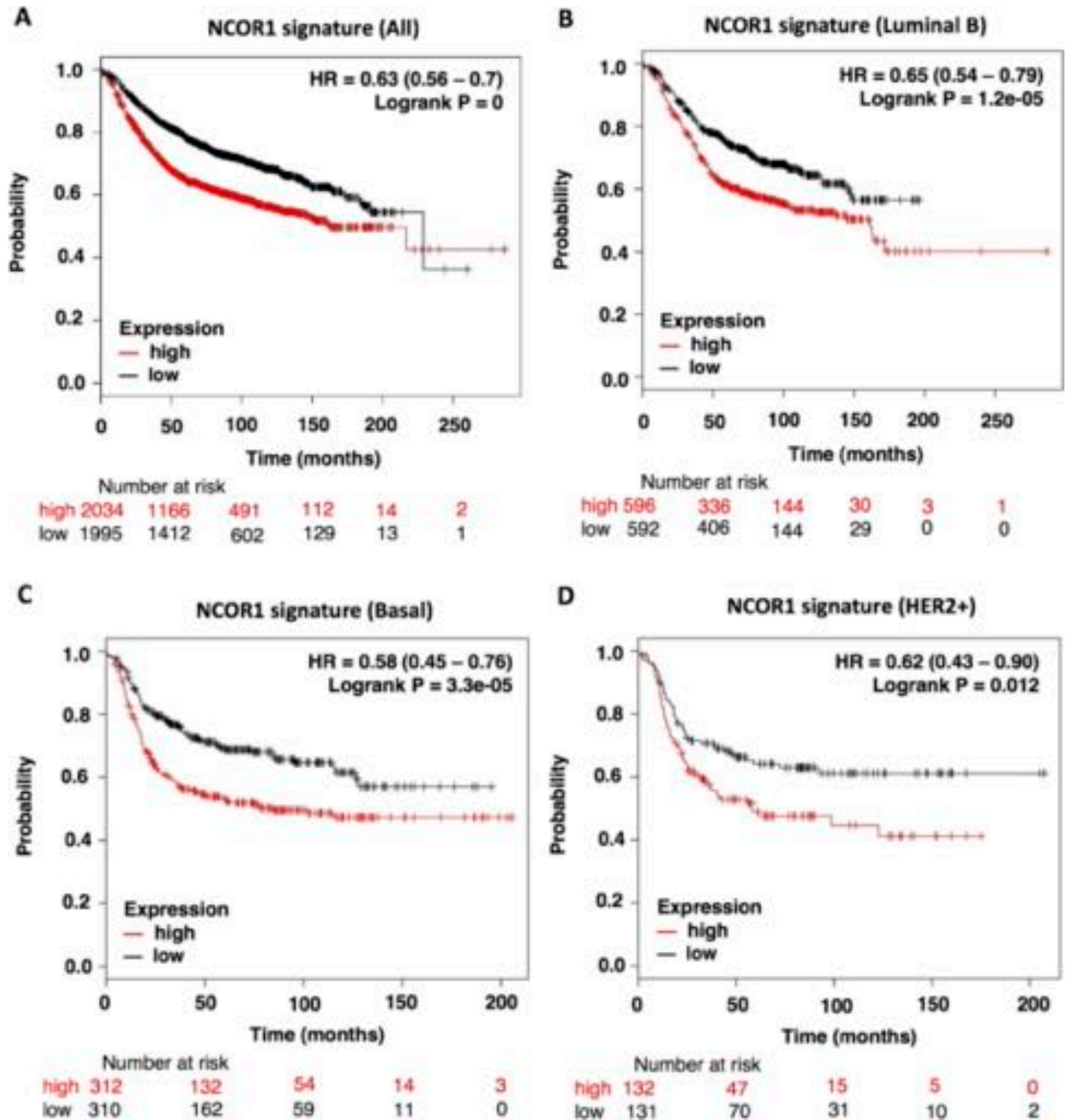
### High NCOR1 transcriptomic levels are associated with good prognosis

If lack of activity of NCOR1 due to mutations is associated with detrimental outcome, elevated levels of the gene would be linked with good prognosis. To explore this idea, we evaluated NCOR1 at a transcriptomic level in relation with outcome in the different breast cancer subtypes. As can be seen in Fig 4, high expression of NCOR1 is associated with better relapse free survival in all breast cancer subtypes, including the luminal A subtype: all breast tumors (HR: 0.7, CI: 0.62–0.78; log rank  $p = 9e-11$ ); luminal B (HR: 0.81, CI: 0.67–0.99; log rank  $p = 0.04$ ); basal (HR: 0.73, CI: 0.57–0.94; log rank  $p = 0.016$ ); HER2 (HR:0.72, CI: 0.49–1.05; log rank  $p = 0.085$ ) and luminal A (HR:0.69, CI: 0.58–0.82; log rank  $p = 2e-05$ ) (Fig 4A–4E).

To investigate the possibility that NCOR1 levels could be associated with response to therapy, we correlated gene expression with clinical outcome based on the response to a selected treatment. Expression levels of NCOR1 did not discriminate responders to anti-HER2 therapy ( $n = 50$ ) or chemotherapy ( $n = 476$ ) in neither the HER2+ER- or triple negative subtypes (S3 Table). However, as it has been previously described (see discussion), expression of this gene was able to predict response to anti-hormonal therapy ( $n = 907$ ).

### Presence of NCOR1 mutations, transcriptomic expression and association with survival in lung cancers

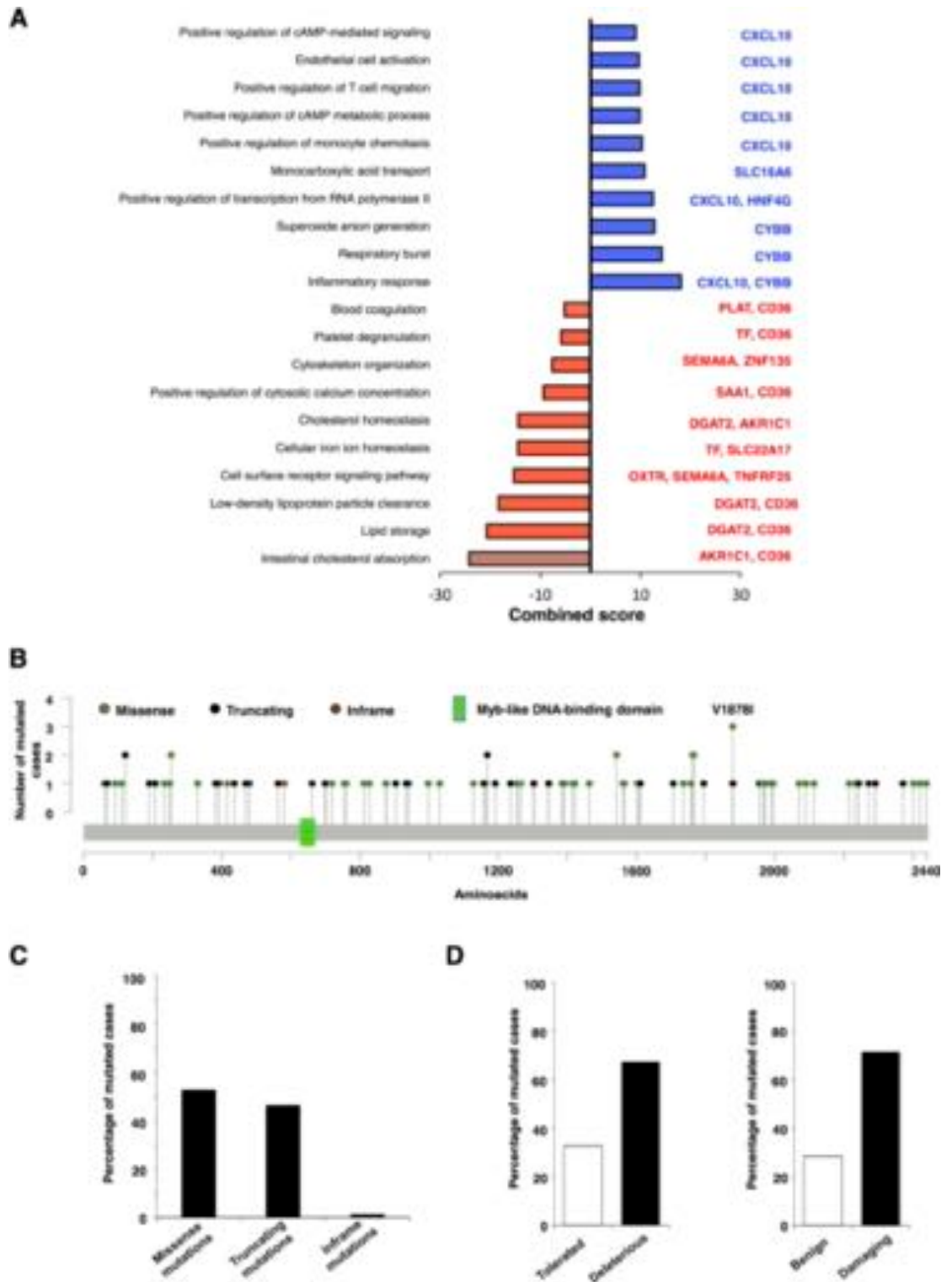
To explore the option that NCOR1 also have a role in other cancer types, we explored if mutations at this gene were linked with detrimental prognosis in lung cancer. Although no association was observed for all the groups, a significant detrimental outcome (RFS) was identified for the subgroup of lung adenocarcinomas (LUAD), particularly for the upper-quartile group (HR: 0.72, CI: 0.51–1.00; log rank  $p = 0.046$ ) (Fig 5A), compared with median cut-off (HR: 0.85, CI: 0.62–1.16; log rank  $p = 0.3$ ) (Fig 5B). Of note, mutations in LUAD was reported in 3.91% of tumors (Fig 1C). Similarly, to breast cancer, we observed that high expression of the



**Fig 2. NCOR1 mutation-associated signature correlates with patients' poor outcome.** OS plots showing the association between survival and NCOR1-mutation-related signature in all breast cancers (A), luminal B (B), basal (C) and HER2+ breast tumors (D) were obtained using Genotype-2-Outcome. This tool found 58, 36, 11 and 7 patients carrying NCOR1 mutations in all breast cancer tumours, luminal B, basal and HER2 positive tumours, respectively. The patients were separated in "high or low" expression groups according to the median value of the mean expression of NCOR1-mutation associated genes.

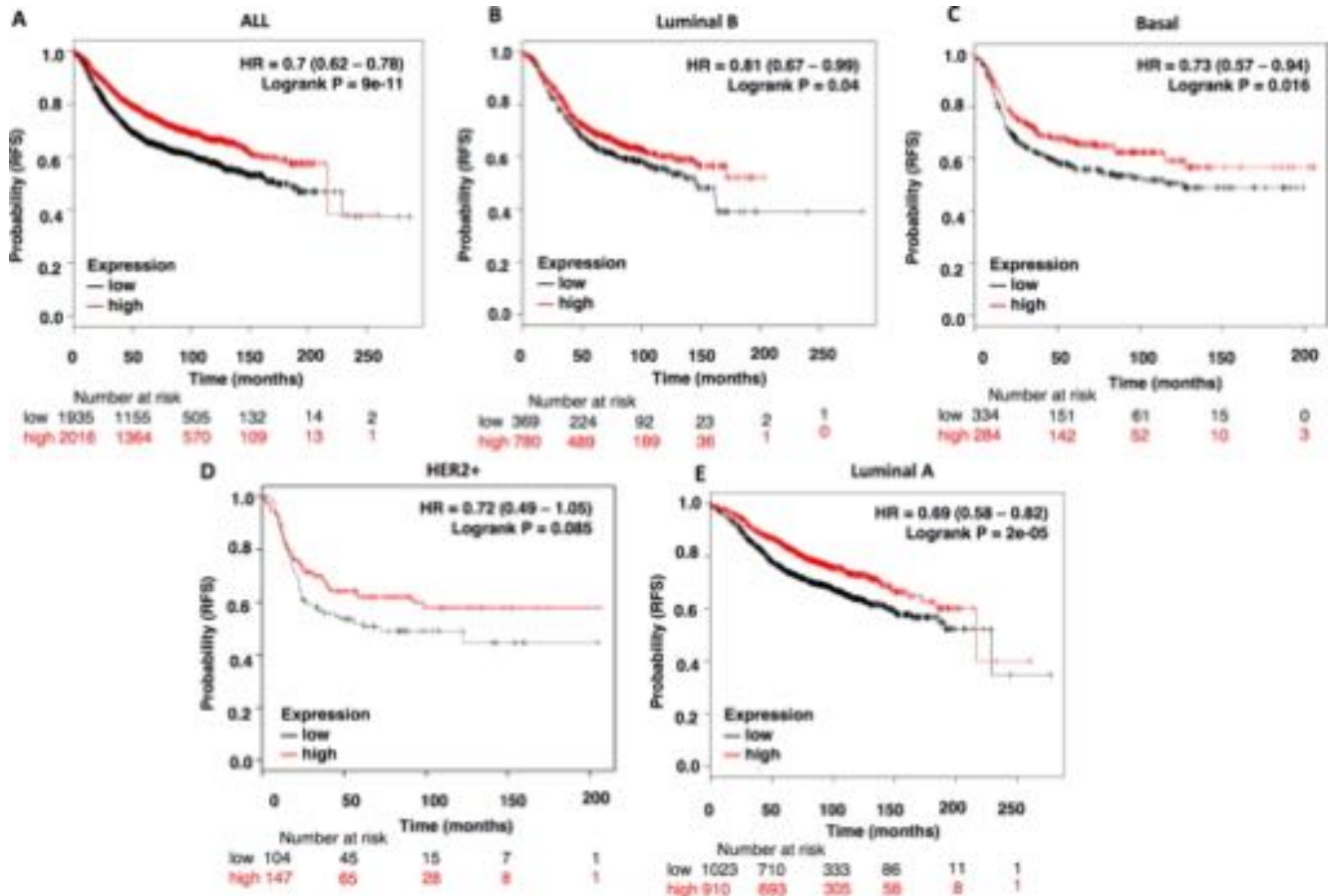
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776.g002>

NCOR1 gene was associated with better overall survival and relapse free survival (HR: 0.38, CI: 0.3–0.48; log rank  $p < 1e-16$ ; HR: 0.26, CI: 0.16–0.41; log rank  $p = 3.9e-10$ ; respectively) (Fig 5C



**Fig 3. Functional analysis of the NCOR1 signature.** A. Mutated NCOR1-associated up (blue) and downregulated (red) biological process. NCOR1-associated genes within each function are indicated. B. Schema of NCOR1 mutations. C. Percentage of frequency of Missense, Truncating and Inframe mutations. D. Percentage of Tolerated versus Deleterious and Benign versus Damaging mutations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776.g003>



**Fig 4. High NCOR1 expression levels correlates with better patients' prognosis.** Kaplan-Meier survival plots showing the association of NCOR1 expression levels with patients' relapse free survival (RFS) for all breast cancers (n = 3951) (A), luminal B (n = 1149) (B), basal (n = 618) (C), HER2+ (n = 251) (D) and Luminal A (n = 1933) (E) breast tumors.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776.g004>

and 5D), suggesting that this gene could behave as a tumor suppressor also in this tumor subtype.

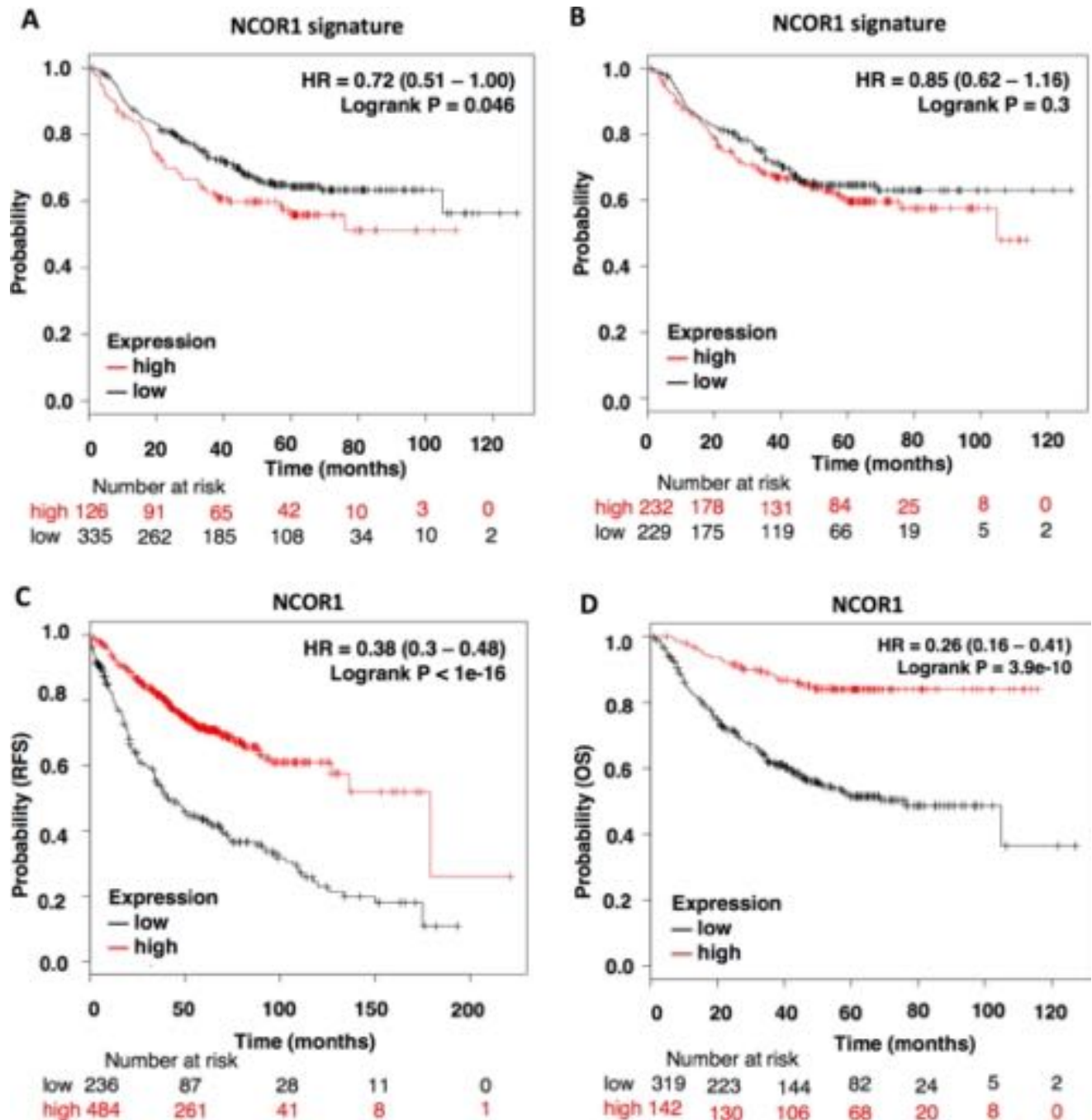
## Discussion

In the present article, we explore mutations associated with genes involved in transcriptional regulation that are linked with detrimental outcome. Among all the identified genes, we focused on NCOR1, as this gene has not been described previously in hormone receptor negative breast tumors.

Deregulation of genes within transcription regulation has been involved in human pathologies, including tumor initiation and progression [5,9]. In our study, we identify different mutated genes within this function including some previously described and other that are more novel. We focused on NCOR1 as this gene was associated with detrimental outcome in all breast subtypes, and its association with survival in hormone receptor negative tumors has not been evaluated before.

Some studies associate loss of expression of NCOR1 with cancer propagation and proliferation. Indeed, NCOR represses the expression of prometastatic genes like CXCR4, COX2, CCR6 and CCR1 [15,16]. NCOR1 has been deeply studied in estrogen receptor positive breast tumors. Loss of expression of NCOR1 has been associated with resistance to hormone therapy,





**Fig 5. NCOR1 expression profile also predict outcome in Lung Adenocarcinoma patients (LUAD).** A-B. Survival plots showing the correlation of NCOR1-mutation related signature with RFS. The patients were separated in “high or low” using upper quartile expression (A) or median expression as the cutoff value (B). C-D. Kaplan-Meier survival plots showing the association of NCOR1 expression levels with patients RFS (n = 720) and OS (n = 461).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207776.g005>

particularly tamoxifen as NCOR1 is a key corepressor for ER $\alpha$  [17,18]. Of note, this data is also in line with our observation linking the presence of the gene with resistance to tamoxifen or aromatase inhibitors. However, the role of NCOR1 mutations, particularly in tumors that do not express the estrogen receptor has not been explored in the mentioned studies.

Mutations in NCOR1 have been also described in other solid tumors, like colorectal cancer or bladder cancer [8, 9]. In most occasions, these mutations were associated with a loss of function of the protein impairing their tumor suppressor capabilities [5, 8]. In our article, we found that NCOR1 mutations in breast cancer are mainly missense and truncating, and produce a deleterious or damaging effect, leading to a nonfunctional protein. The lack of function of this protein is therefore associated with the poor prognosis observed in those patients harboring the mutation. By contrast, we observed that tumors with elevated transcriptomic levels of NCOR1 were linked with good prognosis as the protein levels are higher. Our findings were also confirmed in lung adenocarcinomas, in which no data has been previously described.

A relevant observation was the fact that the expression of the gene was not associated with clinical outcome based on the predicted response to anti-HER2 therapies or chemotherapies, contrary to those treated with hormone therapy. This confirms the role of NCOR1 as a tumor suppressor gene in the estrogen receptor negative tumors.

Finally, it should be mentioned that the low number of mutations in luminal A tumors limits their evaluation in relation with prognosis. We could anticipate that if a dysfunctional protein does exist, then, resistance to hormone therapy could be present.

In conclusion, in the present work we describe the presence and prognostic role of mutations at NCOR1 gene in hormone receptor negative breast and lung adenocarcinomas and we also confirm that NCOR1 is a tumor suppressor gene. Further studies should be performed to explore therapeutic mechanisms to restore its function.

## Supporting information

**S1 Table. Clinical data from the invasive breast carcinoma patients contained in the METABRIC study.**

(PDF)

**S2 Table. Selected mutated genes association with patients' prognosis.**

(PDF)

**S3 Table. Association of NCOR1 expression with therapy response.** Relapse-free survival at five years was used to assign patients to responder (no relapse before 5 years) and non-responder (relapsed before five years) cohorts. Only endocrine therapy (n = 907) reaches high significance while the correlation is negligible for anti-HER2 therapy (n = 50) and chemotherapy (n = 476).

(PDF)

## Acknowledgments

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), Diputación de Albacete and CIBERONC (to A. Ocana); and CRIS Cancer Foundation (to A. Ocana and A. Pandiella). We would like to also thank to the cancer association ACEPAIN for supporting part of this work. E.M. Galan-Moya is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Sara Morcillo-García, Cristina Nieto-Jiménez, Miriam Nuncia-Cantarero, Balázs Györfy, Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocaña.

**Data curation:** María del Mar Noblejas-López, Sara Morcillo-García, Cristina Nieto-Jiménez, Miriam Nuncia-Cantarero, Eva M. Galan-Moya.

**Formal analysis:** Sara Morcillo-García, Cristina Nieto-Jiménez, Miriam Nuncia-Cantarero, Eva M. Galan-Moya.

**Funding acquisition:** Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocaña.

**Methodology:** María del Mar Noblejas-López, Cristina Nieto-Jiménez, Miriam Nuncia-Cantarero, Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocaña.

**Project administration:** Alberto Ocaña.

**Resources:** Cristina Nieto-Jiménez, Balázs Györffy.

**Software:** Balázs Györffy.

**Supervision:** Cristina Nieto-Jiménez, Balázs Györffy, Eva M. Galan-Moya, Atanasio Pandiella, Alberto Ocaña.

**Validation:** Miriam Nuncia-Cantarero, Atanasio Pandiella.

**Visualization:** Miriam Nuncia-Cantarero.

**Writing – original draft:** Alberto Ocaña.

**Writing – review & editing:** María del Mar Noblejas-López, Sara Morcillo-García, Cristina Nieto-Jiménez, Miriam Nuncia-Cantarero, Balázs Györffy, Eva M. Galan-Moya, Atanasio Pandiella, Alberto Ocaña.

## References

1. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 384–400. <https://doi.org/10.1038/nrd3674> PMID: 22498752
2. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664> PMID: 9311776
3. Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson A J, Zheng S et al. Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* 2010; 18: 436–447. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.022> PMID: 21075309
4. Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 2004; 116: 511–526. PMID: 14980219
5. Martinez-Iglesias O, Alonso-Merino E, Aranda A. Tumor suppressive actions of the nuclear receptor corepressor 1. *Pharmacol Res* 2016; 108: 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.027> PMID: 27149915
6. Guenther MG, Barak O, Lazar MA. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6091–6101. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6091-6101.2001> PMID: 11509652
7. Jepsen K, Hermanson O, Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEville RJ et al. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 2000; 102: 753–763. PMID: 11030619
8. Ivanov I, Lo KC, Hawthorn L, Cowell JK, Ionov Y. Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 2873–2884. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210098> PMID: 17086209
9. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet* 2011; 43: 875–878. <https://doi.org/10.1038/ng.907> PMID: 21822268
10. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollen HK, Provenzano E, Bardwell HA et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016; 7:11479. <https://doi.org/10.1038/ncomms11479> PMID: 27161491



11. Pongor L, Kormos M, Hatzis C, Puzsai L, Szabó A, Gyórfy B et al. A genome-wide approach to link genotype to clinical outcome by utilizing next generation sequencing and gene chip data of 6,697 breast cancer patients. *Genome Med* 2015; 7: 104. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0228-1> PMID: 26474971
12. Mihaly Z, Kormos M, Lanczky A, Dank M, Budczies J, Szász MA et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 140: 219–232. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2622-y> PMID: 23836010
13. Menyhart O, Budczies J, Munkacsy G, Esteva FJ, Szabó A, Miquel TP et al. DUSP4 is associated with increased resistance against anti-HER2 therapy in breast cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 77207–77218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20430> PMID: 29100381
14. Gyórfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 725–731. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0674-9> PMID: 20020197
15. Martinez-Iglesias O, Olmeda D, Alonso-Merino E, Gómez-Rey S, González-López AM, Luengo E et al. The nuclear corepressor 1 and the thyroid hormone receptor beta suppress breast tumor lymphangiogenesis. *Oncotarget* 2016; 7: 78971–78984. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12978> PMID: 27806339
16. Martinez-Iglesias OA, Alonso-Merino E, Gomez-Rey S, Velasco-Martín JP, Martín Orozco R, Luengo E et al. Autoregulatory loop of nuclear corepressor 1 expression controls invasion, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E328–337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520469113> PMID: 26729869
17. Lu R, Hu X, Zhou J, Sun J, Zhu AZ, Xu X et al. COPS5 amplification and overexpression confers tamoxifen-resistance in ERalpha-positive breast cancer by degradation of NCoR. *Nat Commun* 2016; 7: 12044. <https://doi.org/10.1038/ncomms12044> PMID: 27375289
18. Cutrupi S, Reineri S, Panetto A, Grosso E, Caizzi L, Ricci L et al. Targeting of the adaptor protein Tab2 as a novel approach to revert tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 2012; 31: 4353–4361 <https://doi.org/10.1038/onc.2011.627> PMID: 22249258

ORIGINAL RESEARCH



## Expression of MHC class I, HLA-A and HLA-B identifies immune-activated breast tumors with favorable outcome

María del Mar Noblejas-López<sup>a</sup>, Cristina Nieto-Jiménez<sup>a</sup>, Sara Morcillo García<sup>a</sup>, Javier Pérez-Peña<sup>a</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>a</sup>, Fernando Andrés-Pretel<sup>a</sup>, Eva M. Galán-Moya<sup>a</sup>, Eitan Amir<sup>b</sup>, Atanasio Pandiella<sup>c,d</sup>, Balázs Györffy<sup>e</sup>, and Alberto Ocaña<sup>a,c,f</sup>

<sup>a</sup>Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomedicas, Castilla-La Mancha University (CRIB-UCLM), Albacete, Spain; <sup>b</sup>Division of Medical Oncology and Hematology, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Toronto, Canada; <sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain; <sup>d</sup>CIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>e</sup>Semmelweis University 2nd Department of Pediatrics, Budapest, Hungary and MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Institute of Enzymology, Budapest, Hungary; <sup>f</sup>Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico Universitario San Carlos, IDISSC and CIBERONC, Madrid, Spain

### ABSTRACT

Antigen recognition by MHC class I molecules is a key step for the initiation of the immune response. We hypothesized that expression of these molecules could be a marker of immune-activated breast cancers. Data from KM Plotter were extracted to develop an exploratory cohort. Information from Cancer Genome Atlas (TCGA) and METABRIC was used to create two validation cohorts. Raw data were re-processed and analyzed using plyr R and Bioconductor. We predicted epitope-HLA binding to MHC I molecules by using NetMHC 4.0. Cox proportional hazards regression was computed to correlate gene expression and survival outcome. There was a weak but positive correlation between mutational burden and the expression of most MHC class I molecules. In the exploratory cohort, expression of HLA-A and HLA-B was associated with favorable relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) in the basal-like subgroup. This was confirmed in the METABRIC and TCGA dataset. Expression of HLA-A and HLA-B was associated with biomarkers of T cell activation (GZMA, GZMB, and PRF1) and improved the predictive capacity of known immunologic signatures. Several neopeptides expressed in breast cancer were also identified including FUK, SNAPC3, GC, ANO8, DOT1L, HIST1H3F, MYBPH, STX2, FRMD6, CPSF1, or SMTN, among others. Expression of HLA A and B is associated with T cell activation and identifies immune activated, basal-like breast cancers with favorable prognosis. Antigen recognition markers should be incorporated into the assessment of the tumor immune state of basal-like breast patients.

### ARTICLE HISTORY

Received 23 March 2019  
Revised 5 June 2019  
Accepted 6 June 2019

### KEYWORDS

HLA-A; HLA-B; MHC-I; breast cancer; basal-like breast; immune reactivated

## Introduction

Immunotherapy has become a standard of care for the treatment of many solid tumors. Moreover, it is expected that in the future, immunomodulators alone or in combination with other therapies will be the main therapy in many indications<sup>1</sup>. Recent examples of tumor types in which immunotherapy has produced clinical activity include, among others, melanoma, non-small cell lung cancer, bladder cancer, and head and neck tumors.<sup>1,2</sup>

The mechanism of action of approved immunotherapies is based on reduction of inhibitory signals, leading to activation of an immune response against the tumor.<sup>2</sup> This is achieved by targeting immune checkpoint inhibitors with antibodies like those binding PD1, PD-L1, or CTLA-4.<sup>3</sup> The inhibition of these transmembrane molecules facilitates the activation of an anti-tumor T cell response.<sup>3</sup> However, this effect is not produced in all treated tumors and, in addition, it is not absent of secondary effects.<sup>2</sup> In this context, identification of tumors that will respond to immunotherapy is the main goal to increase efficacy, while avoiding undesirable toxicities.<sup>2</sup> For

checkpoint inhibitors, it has been suggested that the immune system must be activated against the tumor in order to induce an anti-tumor response, a scenario called a “hot tumor”.<sup>3</sup> Identification of those responsive tumors and the development of strategies to reverse unresponsive ones to make them sensitive is challenging, but represents one of the most demanding needs in this area.<sup>4</sup> Data support that high mutational burden is associated with a higher response to immunotherapy.<sup>1,5,6</sup> However, there are sparse data on any other marker of benefit.

A key step in the initiation of the immune response is the recognition and presentation of tumor antigens to effector cells like CD8 + T cells.<sup>7</sup> The major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules play a central role in this process by presenting native intracellular proteins or neoantigens produced by cancer cells to effector CD8 + T cells, therefore, initiating an immune response.<sup>7-9</sup> We hypothesized that expression of MHC-I molecules could be a surrogate marker for “hot tumors” and, therefore, these tumors would be associated with better prognosis, due to increased adaptive antitumor immune response. This hypothesis is supported by recent

data suggesting that human leukocyte antigen (HLA) class I genotype influences response to checkpoint inhibitors.<sup>10</sup>

In addition, administration of some therapies including chemotherapy can indirectly activate the immune system by increasing the genomic instability and by releasing tumor neoantigens.<sup>11–13</sup> In this context, those tumors that express a higher level of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) respond better to chemotherapy and are associated with favorable outcome.<sup>14–16</sup>

In our study, we aimed to explore the presence and prognostic role of MHC-I in breast tumors and their association with mutational tumor burden and prognosis. In addition, we explored the pattern of mutations associated with the presence of MHC class I genes describing potential neopeptides produced by these tumors.

## Results

### Association of human MHC-I components with mutational burden

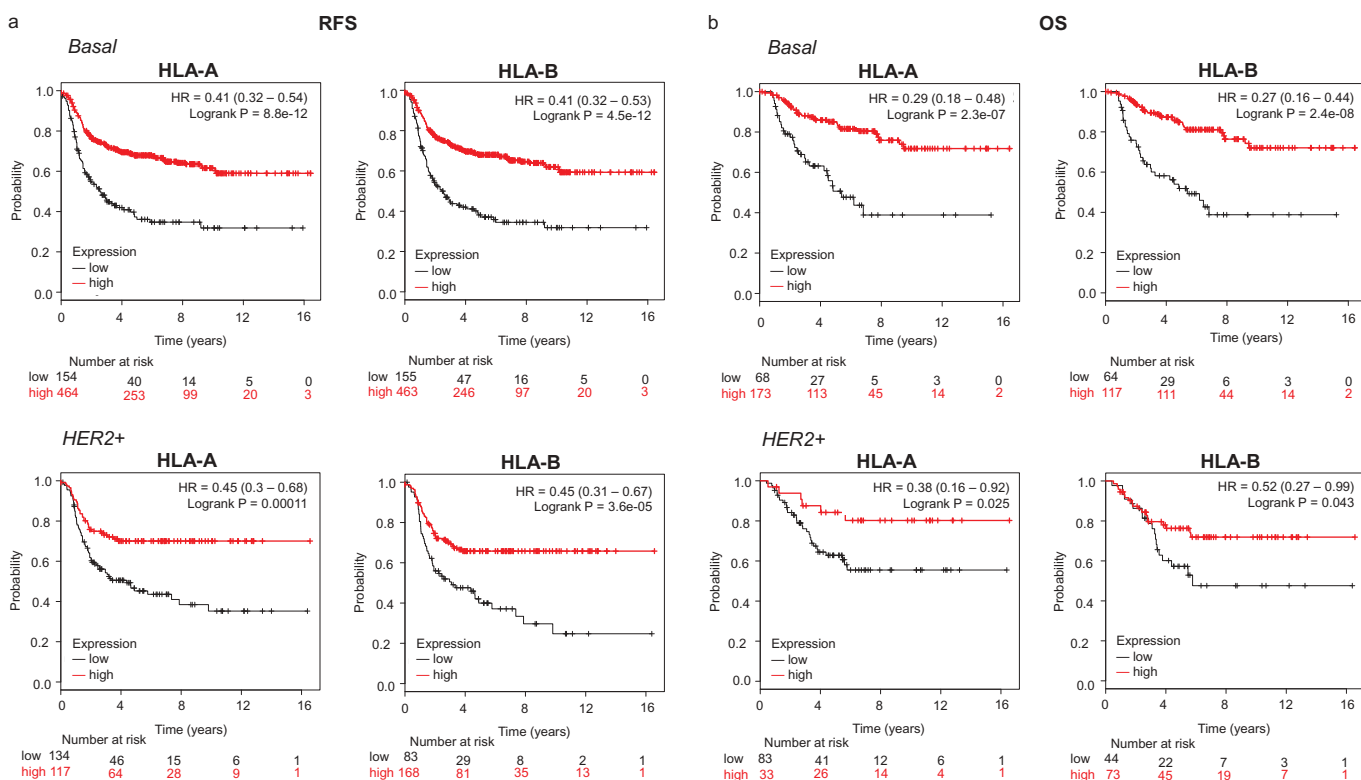
We observed that there was a weak but positive correlation between mutational burden and the expression of most HLA genes. Those HLA molecules with higher magnitude association included HLA-A, HLA-B, and HLA-H. For others like HLA DOA and HLA J, the association was negative (Supplementary Figure 1A).

### MHC-I expression and breast cancer prognosis

Given the association between mutational load and HLA A and B expression, we then explored their correlation with clinical outcome in the different breast cancer subtypes. HLA-H was not considered for further studies as it has been described as a pseudogene of HLA-A.<sup>17</sup>

An association between both HLA-A and HLA-B with favorable relapse-free survival (RFS) was observed in the basal-like (HLA-A, HR: 0.41, CI 0.32–0.54; Log rank  $p < .001$  and HLA-B, HR: 0.41, CI 0.32–0.53; Log rank  $p < .001$ ) and HER2-enriched breast cancer subtypes (HLA-A, HR: 0.45, CI 0.3–0.68; Log rank  $p < .001$  and HLA-B, HR: 0.45, CI 0.31–0.67; Log rank  $p < .001$ ) (Figure 1(a)). Of note, no association with patient outcome, as measured by RFS, was observed in the luminal A subtype, and a weak association was found in the Luminal B subtype (Supplementary Figure 2A). Next, we evaluated the prognostic role of HLA-A and HLAB in relation to overall survival (OS) in the basal-like and HER2-enriched tumors. In a similar manner, both molecules were associated with favorable OS, particularly in basal-like tumors (HLA-A, HR: 0.29, CI 0.18–0.48; Log rank  $p < .001$ ; and HLA-B, HR: 0.27, CI 0.16–0.44; Log rank  $p < .001$ ) (Figure 1(b)). Again for luminal A and B no correlation was identified for OS, with the exception of HLA A in luminal B tumors (Supplementary Figure 2B).

For the confirmatory cohorts, the basal-like subtype displayed the strongest association with outcome in both



**Figure 1.** Transcriptomic expression of HLA-A and HLA-B, and association with clinical outcome in an exploratory cohort of breast cancer patients. Kaplan-Meier survival plots show the association between HLA-A and HLA-B expression levels and patient prognosis, including relapse-free survival (RFS) (A) and overall survival (OS) (B) for basal ( $n = 879$ ) and HER2+ ( $n = 335$ ) breast tumors, respectively.

validation datasets (Cohort 1: OS HLA-A, HR: 0.59, CI 0.42–0.82; Log rank  $p = .002$ ; HLA-B, HR: 0.60, CI 0.44–0.82; Log rank  $p = .001$ ; cohort 2: OS HLA-A, HR: 0.34, CI 0.16–0.75; Log rank  $p = .005$ ; HLA-B, HR: 0.21, CI 0.006–0.71; Log rank  $p = .005$ ) (Figure 2(a,b)). Association with outcome was also observed for the HER2 subtype, although this association was not as strong as for basal tumors (Figure 2(a,b)). A combined analysis of the benefit observed by tumor subtype is observed for HLA-A and HLA-B in Supplementary Figure 3A and B for RFS and OS, respectively, demonstrating the mayor effect identified in the basal like and HER2 subtypes.

Since mutations in MHC-I components have been associated with a lack of response to immune checkpoint inhibitors,<sup>18</sup> we evaluated the presence of mutations in HLA genes. Using TCGA data, we did not observe any association between mutations in HLA-A and HLA-B and prognosis (Cox regression  $p = .36$ ). However, the numbers of patients with such mutations was low ( $n = 13$ ).

### Pattern of mutations and expression of HLA-A and HLA-B

Using data from TCGA, we next explored the pattern of mutations associated with the upregulation of HLA-A and HLA-B. A list of all genes found to be mutated with their corresponding correlation values is shown in Figure 3(a). When both HLA-A and HLA-B were upregulated, functional analyses of the mutated genes showed that they fall into the transcription regulation and immune response categories

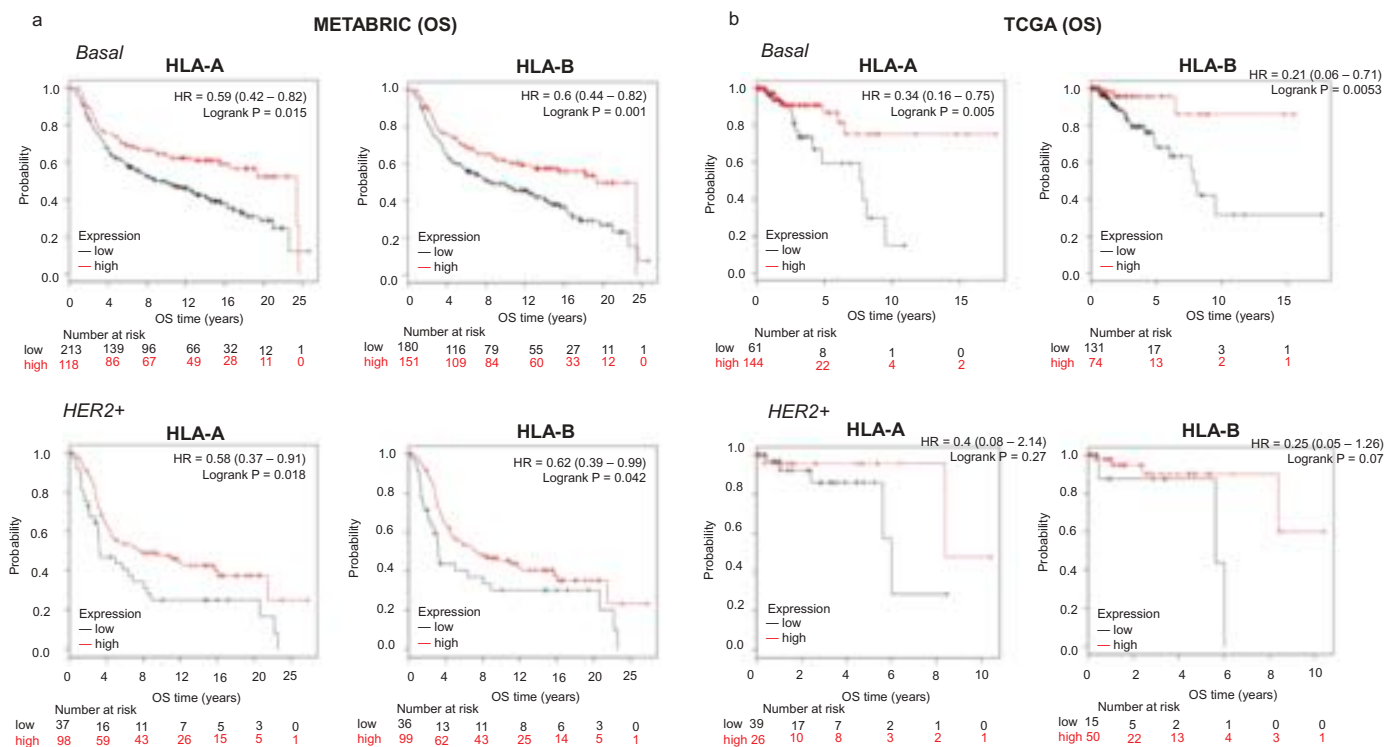
(Figure 3(b)). Considering exclusively the upregulation of HLA-A, the most frequently mutated genes were included in protein and lipid transport, and DNA repair. In the case of HLA-B, genes coding for immune response and protein and lipid transport were identified (Figure 3(c)).

### Identification of neoantigens in mutated tumors

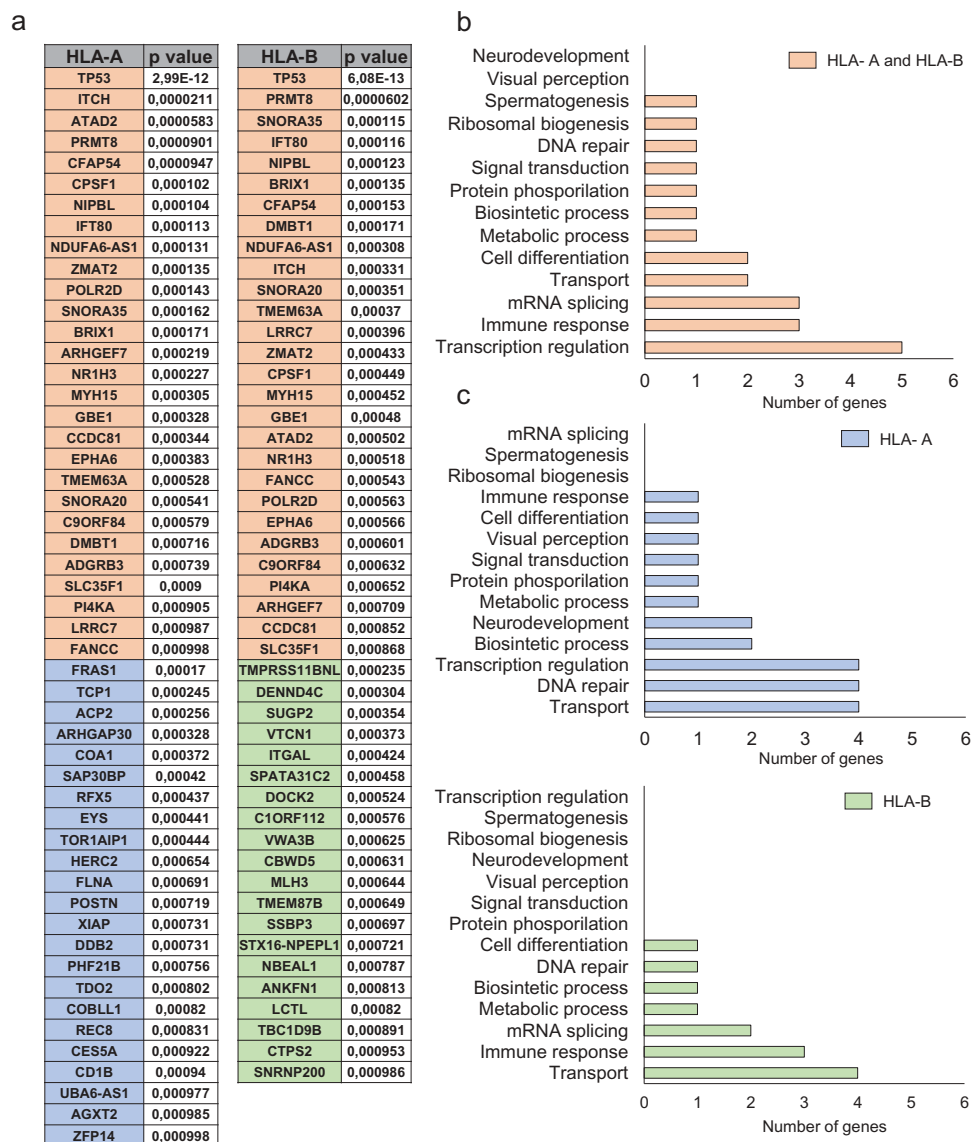
Once the most frequently mutated genes in tumors with upregulation of HLA-A and HLA-B were recognized, we aimed to identify potential neoantigens that could be produced by those altered genetic sequences. As can be seen in Table 1, several mutations do lead to peptides that can result in high-affinity binding with MHC-I molecules. Some of these showed a high grade of affinity with % Rank below 0.5 like *FUK*, *SNAPC3*, *GC*, *ANO8*, *DOT1L*, *HIST1H3F*, *MYBPH*, *STX2*, *FRMD6*, *CPSF1*, or *SMTN*, among others.

### Association between HLA-A and HLA-B and t cell activation

Expression of granzyme A (*GZMA*), granzyme B (*GZMB*), and *PRF1* have been described as markers of T cell activation measured by gene expression in cohorts of patients.<sup>19</sup> In this context, we investigated the association of *HLA-A* and *HLA-B* expression with levels of *GZMA*, *GZMB* and *PRF1* using data from TCGA. As shown in Figure 4(a), a strong and positive correlation was observed between the expression of *HLA-A* and *HLA-B* and activation of effector T cells. These data confirm the capacity of



**Figure 2.** Transcriptomic expression of HLA-A and HLA-B, and association with clinical outcome in two validation cohorts (METABRIC and TCGA) of breast cancer patients. Kaplan-Meier survival plots using data from the METABRIC project (A) and TCGA (B) show the association of HLA-A and HLA-B expression levels, with patient overall survival (OS), for basal and HER2+ breast tumors.



**Figure 3.** Functional analyses for mutated genes associated with high HLA-A and HLA-B expression levels. A. List of mutated genes associated ( $p < 0,001$ ) with upregulation of HLA-A and HLA-B (orange), HLA-A (blue) and HLA-B (green). The total number of genes for each function for HLA-A and HLA-B jointly (B) and individually (C). The selection of genes and their respective functions are described in material and methods.

HLA-A and -B to identify hot tumors that have capacity to mediate an immune T cell response. Finally, given the fact that the strongest association with T cell activation and outcome was observed in basal-like tumors, we aimed to explore the expression of HLA A and -B by tumor subtype. As shown in Figure 4(b), the highest expression of *HLA-A* and *HLA-B* was observed for the basal-like subtype followed by the HER2-enriched subtype.

### Prognosis of HLA-A and HLA-B based on immune signatures

As can be seen in Figure 4(c), the predictive capacity of *HLA-A* and *HLA-B*, was similar to the other signatures, particularly in the basal-like population. However, the inclusion of HLA-A and HLA-B to the described signatures improved their prognostic value, suggesting that antigen recognition is a key step to identify “hot tumors” (Figure 4(d)).

### Discussion

The presence of immune infiltration in the tumor is a marker of favorable outcome, particularly in basal-like and HER2 positive breast tumors.<sup>14,15</sup> For T cells to be activated, and therefore mediate an immune response, effective antigen presentation within the tumor is a key step.<sup>10,12</sup> In our article, we identify that breast cancer tumors with high expression of the MHC-I molecules HLA-A and HLA-B, have an increased immune T cell activation and, consequently, favorable prognosis.

We first explored the association of MHC molecules with mutational load. We did so as data suggest an association between the total number of somatic mutations and immune infiltration.<sup>6,11</sup> We identified a positive but weak correlation between mutational burden and MHC-I, HLA-A, HLA-B, and HLA-H.

When we evaluated the prognostic value of HLA-A and HLA-B, we found that their upregulation was associated with



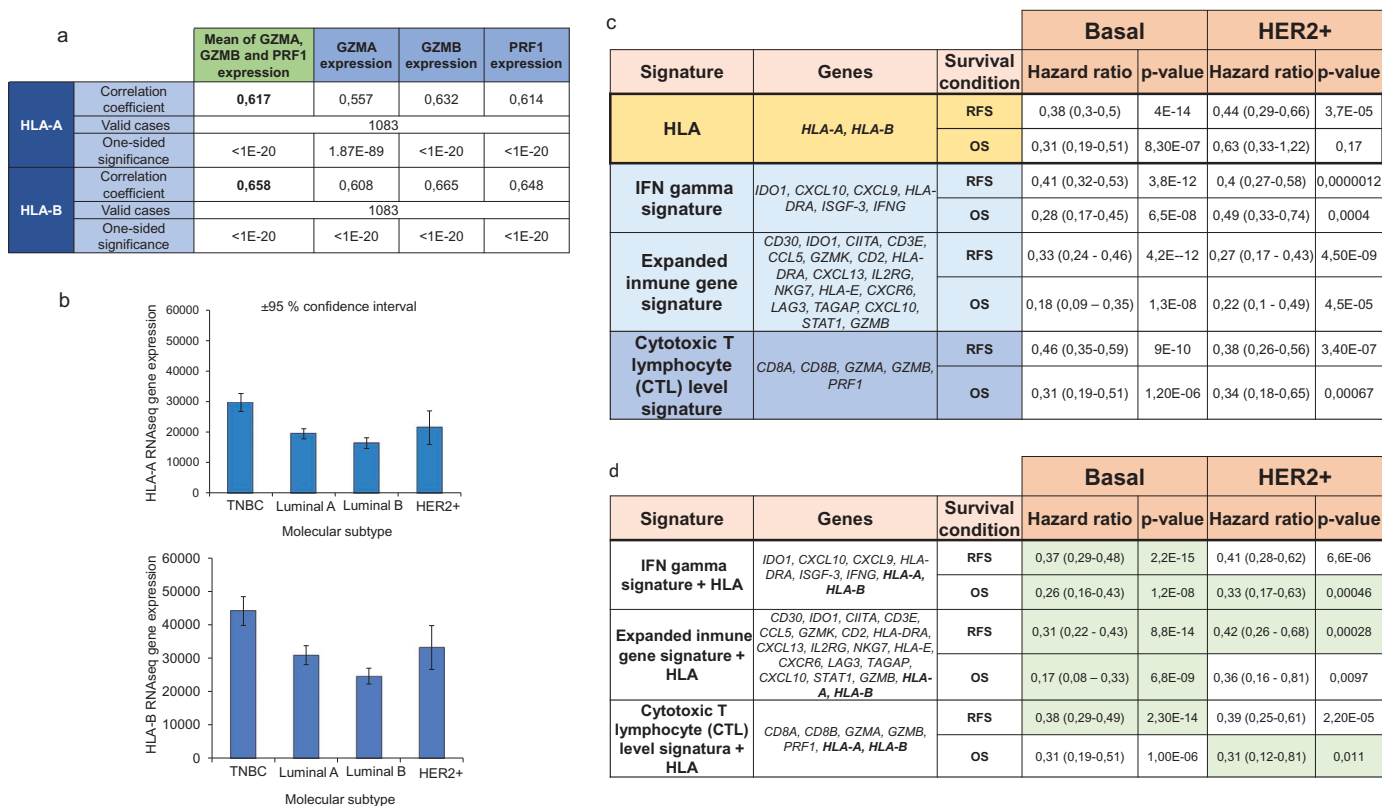
**Table 1.** Neoantigen sequences of the identified mutated genes and their binding affinity with HLA molecules as described in material and methods. Specific mutations induce new antigen proteins which are recognized for peptides of HLA isoforms. Affinity is shown with % Rank.

	Gene	Mutation	Original sequence	Mutated sequence	Recognition peptide	nM	Rank
HLA-A0101	<b>FUK</b>	M318I	QPLT <b>M</b> AYVS	QPLT <b>I</b> AYVS	AT <b>Q</b> PLT <b>I</b> AY	43.9	0.08
	<b>SNAPC3</b>	T129S	TDLV <b>T</b> LGVR	TDLV <b>S</b> LGVR	DT <b>D</b> LV <b>S</b> LG <b>V</b>	161.2	0.2
	<b>LCTL</b>	R347W	HFT <b>T</b> RYITE	HFT <b>W</b> YITE	GT <b>G</b> HFT <b>W</b> Y	239.8	0.25
	<b>TDO2</b>	T30A	DKS <b>Q</b> TGVNR	DKS <b>A</b> QGVNR	AT <b>D</b> KS <b>Q</b> AG <b>V</b>	456.7	0.4
HLA-A0201	<b>SNAPC3</b>	T129S	TDLV <b>T</b> LGVR	TDLV <b>S</b> LGVR	YLD <b>T</b> D <b>L</b> V <b>S</b> L	5	0.03
	<b>GC</b>	T347A	MDKY <b>T</b> FELS	MDKY <b>A</b> FELS	L <b>M</b> D <b>K</b> Y <b>A</b> F <b>E</b> L	6.6	0.06
	<b>DOT1L</b>	V240M	SVIF <b>V</b> NNFA	SVIF <b>M</b> NNFA	F <b>M</b> N <b>N</b> F <b>A</b> N <b>F</b> A	9.7	0.125
	<b>CPSF1</b>	S356T	DGM <b>R</b> SVRAF	DGM <b>T</b> SVRAF	AL <b>A</b> D <b>G</b> M <b>R</b> T <b>V</b>	16.3	0.25
HLA-A0301	<b>ANO8</b>	E116Q	TATY <b>E</b> SLLR	TATY <b>Q</b> SLLR	A <b>T</b> Y <b>Q</b> S <b>L</b> L <b>R</b>	11.9	0.025
	<b>OGN</b>	G280A	PIV <b>L</b> GKHPN	PIV <b>A</b> LKHPN	S <b>A</b> Y <b>P</b> I <b>V</b> L <b>A</b> K	27.1	0.125
	<b>FBXW10</b>	R532T	LKT <b>F</b> RHKDP	LKT <b>T</b> FHKDP	K <b>T</b> F <b>T</b> H <b>K</b> D <b>P</b> K	54.2	0.25
HLA-A2402	<b>DOT1L</b>	V240M	SVIF <b>V</b> NNFA	SVIF <b>M</b> NNFA	I <b>F</b> M <b>N</b> N <b>F</b> A <b>N</b> F	15.1	0.015
	<b>HIST1H3F</b>	S58L	RYQ <b>K</b> STELL	RYQ <b>L</b> STELL	R <b>Y</b> Q <b>L</b> ST <b>E</b> L <b>L</b>	18.9	0.02
HLA-A2601	<b>LCTL</b>	R347W	HFT <b>T</b> RYITE	HFT <b>W</b> YITE	W <b>Y</b> I <b>T</b> E <b>W</b> S <b>L</b> L	58.7	0.125
	<b>MYBPH</b>	I230V	DQD <b>S</b> ILFIR	DQD <b>V</b> LFIR	E <b>I</b> P <b>D</b> S <b>V</b> I <b>F</b> M	24.6	0.04
	<b>STX2</b>	I232M	MIN <b>N</b> IERNV	MIN <b>M</b> IERNV	E <b>V</b> K <b>K</b> M <b>I</b> N <b>N</b> M	48.1	0.07
	<b>VNN2</b>	D81N	V <b>T</b> PEDALYG	V <b>P</b> ENALYG	D <b>V</b> T <b>P</b> E <b>N</b> A <b>L</b> Y	88.6	0.1
	<b>ANO8</b>	V759L	FGY <b>V</b> LFSS	FGY <b>L</b> LFSS	E <b>M</b> F <b>G</b> Y <b>V</b> L <b>L</b> F	329.9	0.25
		R105C	HRH <b>T</b> RAYAF	HRH <b>C</b> AYAF	C <b>A</b> Y <b>A</b> F <b>T</b> A <b>T</b> Y	347.7	0.25
HLA-B0702	<b>GP1BA</b>	S601W	FLR <b>G</b> SLPTF	FLR <b>A</b> SLPTF	F <b>L</b> R <b>G</b> W <b>L</b> P <b>T</b> F	670.7	0.4
	<b>FRMD6</b>	H418P	SSA <b>I</b> HRK <b>L</b> K	SSA <b>I</b> P <b>R</b> K <b>L</b> K	I <b>P</b> R <b>K</b> L <b>K</b> L <b>E</b> L	4.8	0.01
	<b>CPSF1</b>	G923R	E <b>E</b> G <b>A</b> R <b>A</b> R <b>G</b> R	E <b>E</b> G <b>A</b> R <b>A</b> R <b>G</b> R	<b>G</b> A <b>R</b> A <b>R</b> G <b>R</b> A <b>L</b>	10.6	0.04
HLA-B0801	<b>GHRL</b>	E66K	GGQ <b>A</b> E <b>G</b> A <b>E</b> D	GGQ <b>Q</b> A <b>G</b> A <b>E</b> D	R <b>A</b> R <b>G</b> R <b>A</b> L <b>R</b> L	19.1	0.09
	<b>GTPBP3</b>	R323W	V <b>R</b> R <b>A</b> R <b>E</b> R <b>L</b> E	V <b>R</b> R <b>A</b> W <b>E</b> R <b>L</b> E	S <b>P</b> R <b>G</b> G <b>G</b> Q <b>A</b> K	36.6	0.175
	<b>SMTN</b>	M703T	SG <b>S</b> T <b>M</b> Q <b>T</b> K	SG <b>S</b> T <b>T</b> Q <b>T</b> K	R <b>A</b> R <b>E</b> V <b>R</b> R <b>A</b> W	40.9	0.2
	<b>CNPY3</b>	G223R	A <b>A</b> L <b>G</b> R <b>K</b> K <b>S</b> K	A <b>A</b> L <b>G</b> R <b>K</b> K <b>S</b> K	R <b>A</b> R <b>E</b> V <b>R</b> R <b>A</b> W	40.9	0.2
HLA-B1501	<b>CPSF1</b>	G923R	E <b>E</b> G <b>A</b> R <b>A</b> R <b>G</b> R	E <b>E</b> G <b>A</b> R <b>A</b> R <b>G</b> R	T <b>M</b> Q <b>T</b> K <b>R</b> H <b>L</b>	23.4	0.07
	<b>KLC1</b>	E325Q	K <b>R</b> A <b>L</b> E <b>I</b> R <b>E</b> K	K <b>R</b> A <b>L</b> Q <b>I</b> R <b>E</b> K	L <b>G</b> R <b>K</b> K <b>S</b> K <b>A</b> A	25.3	0.07
	<b>CPSF1</b>	P262H	L <b>T</b> S <b>L</b> P <b>F</b> D <b>C</b> T	L <b>T</b> S <b>L</b> H <b>F</b> D <b>C</b> T	<b>G</b> A <b>R</b> A <b>R</b> G <b>R</b> A <b>L</b>	69.1	0.2
	<b>FBXW10</b>	Q788E	KAQ <b>K</b> Q <b>G</b> Q <b>L</b> E	KAQ <b>K</b> E <b>G</b> Q <b>L</b> E	R <b>A</b> R <b>G</b> R <b>A</b> L <b>R</b> L	123.1	0.4
HLA-B2705	<b>ANO8</b>	R105C	HRH <b>T</b> RAYAF	HRH <b>C</b> AYAF	Q <b>I</b> R <b>E</b> K <b>K</b> Q <b>L</b>	172.9	0.4
	<b>CPSF1</b>	H964P	AL <b>R</b> L <b>H</b> P <b>M</b> A <b>I</b>	AL <b>R</b> L <b>P</b> P <b>M</b> A <b>I</b>	S <b>L</b> H <b>F</b> D <b>C</b> T <b>P</b> F	20.2	0.175
HLA-B3901	<b>HIST1H3F</b>	S58L	RYQ <b>K</b> STELL	RYQ <b>L</b> STELL	A <b>Q</b> K <b>E</b> G <b>Q</b> L <b>E</b> F	24.1	0.25
	<b>FBXW10</b>	T983A	FRV <b>N</b> TEFVL	FRV <b>N</b> A <b>E</b> FVL	H <b>R</b> H <b>T</b> C <b>A</b> Y <b>A</b> F	18	0.06
	<b>CPSF1</b>	T266P	P <b>F</b> D <b>C</b> Q <b>A</b> L	P <b>F</b> D <b>C</b> P <b>Q</b> A <b>L</b>	G <b>R</b> A <b>L</b> R <b>L</b> P <b>P</b> M	30.7	0.125
	<b>ANO8</b>	R105C	HRH <b>T</b> RAYAF	HRH <b>C</b> AYAF	L <b>R</b> Y <b>Q</b> K <b>L</b> T <b>E</b> L	59.5	0.25
HLA-B4001	<b>FBXW10</b>	T983A	FRV <b>N</b> TEFVL	FRV <b>N</b> A <b>E</b> FVL	F <b>R</b> V <b>N</b> A <b>E</b> F <b>V</b> L	61.7	0.3
	<b>RDY</b>	E499Q	E <b>A</b> S <b>A</b> E <b>L</b> S <b>N</b> E	E <b>A</b> S <b>A</b> Q <b>L</b> S <b>N</b> E	T <b>P</b> F <b>D</b> C <b>P</b> Q <b>A</b> L	10.2	0.025
	<b>OGN</b>	D112H	E <b>V</b> D <b>I</b> D <b>A</b> V <b>P</b> P	E <b>V</b> D <b>I</b> H <b>A</b> V <b>P</b> P	H <b>R</b> H <b>T</b> C <b>A</b> Y <b>A</b> F	13.5	0.04
	<b>ANO8</b>	V759L	FGY <b>V</b> LFSS	FGY <b>L</b> LFSS	F <b>R</b> V <b>N</b> A <b>E</b> F <b>V</b> L	16.9	0.05
	<b>FUK</b>	S56R	K <b>R</b> V <b>G</b> S <b>G</b> G <b>A</b> T	K <b>R</b> V <b>G</b> R <b>G</b> G <b>A</b> T	A <b>Q</b> L <b>S</b> N <b>E</b> A <b>A</b> L	93	0.175
	<b>ATAD3A</b>	M432I	D <b>V</b> A <b>P</b> M <b>G</b> R <b>E</b> G	D <b>V</b> A <b>P</b> I <b>G</b> R <b>E</b> G	I <b>H</b> A <b>V</b> P <b>P</b> P <b>L</b>	80.8	0.175
	<b>KLC1</b>	Y313H	K <b>R</b> G <b>K</b> Y <b>K</b> E <b>A</b> E	K <b>R</b> G <b>K</b> H <b>K</b> E <b>A</b> E	L <b>K</b> E <b>M</b> F <b>G</b> Y <b>V</b> L	116.5	0.2
	<b>RAB10</b>	F10L	Y <b>D</b> L <b>L</b> F <b>K</b> L <b>L</b> L	Y <b>D</b> L <b>L</b> L <b>K</b> L <b>L</b> L	G <b>R</b> G <b>G</b> A <b>T</b> O <b>P</b> L	195	0.3
	<b>LCTL</b>	D459H	W <b>S</b> L <b>L</b> D <b>K</b> F <b>E</b> W	W <b>S</b> L <b>L</b> H <b>K</b> F <b>E</b> W	S <b>K</b> A <b>A</b> D <b>V</b> A <b>P</b> I	189.4	0.3
	<b>SNAPC3</b>	T129S	TDLV <b>T</b> LGVR	TDLV <b>S</b> LGVR	H <b>K</b> E <b>A</b> E <b>K</b> R <b>A</b> L	194.1	0.3
	<b>ANO8</b>	V759L	FGY <b>V</b> LFSS	FGY <b>L</b> LFSS	E <b>R</b> L <b>E</b> Y <b>D</b> L <b>L</b> L	267.8	0.4
	<b>OGN</b>	K119T	P <b>L</b> P <b>K</b> E <b>S</b> A <b>Y</b>	P <b>L</b> P <b>K</b> E <b>S</b> A <b>Y</b>	H <b>K</b> F <b>E</b> W <b>A</b> G <b>G</b> I	246.9	0.4
HLA-B4001	<b>DOT1L</b>	E46G	R <b>W</b> V <b>C</b> E <b>I</b> P <b>D</b>	R <b>W</b> V <b>C</b> E <b>I</b> P <b>D</b>	Y <b>L</b> D <b>T</b> D <b>L</b> V <b>S</b> L	268.9	0.4
	<b>RAB10</b>	F10L	Y <b>D</b> L <b>L</b> F <b>K</b> L <b>L</b> L	Y <b>D</b> L <b>L</b> L <b>K</b> L <b>L</b> L	K <b>E</b> M <b>F</b> G <b>Y</b> V <b>L</b> L	4.3	0.01
	<b>FBXW10</b>	T983A	FRV <b>N</b> TEFVL	FRV <b>N</b> A <b>E</b> FVL	K <b>E</b> S <b>A</b> Y <b>P</b> I <b>V</b> L	6.2	0.015
	<b>UBA5</b>	R17Q	Q <b>E</b> L <b>E</b> R <b>E</b> L <b>A</b> Q	Q <b>E</b> L <b>E</b> Q <b>E</b> L <b>A</b> Q	G <b>E</b> I <b>P</b> D <b>S</b> V <b>I</b> F	11.2	0.05
	<b>GTPBP3</b>	R323W	V <b>R</b> R <b>A</b> R <b>E</b> R <b>L</b> E	V <b>R</b> R <b>A</b> W <b>E</b> R <b>L</b> E	L <b>E</b> Y <b>D</b> L <b>L</b> L <b>K</b> L	17.2	0.08
	<b>SNAPC3</b>	G178E	M <b>I</b> E <b>G</b> E <b>L</b> I <b>L</b>	M <b>I</b> E <b>E</b> E <b>L</b> I <b>L</b>	L <b>E</b> F <b>R</b> V <b>N</b> A <b>E</b> F	90.6	0.3
	<b>LCTL</b>	R347W	HFT <b>T</b> RYITE	HFT <b>W</b> YITE	L <b>E</b> Q <b>E</b> L <b>E</b> Q <b>E</b> L	126.1	0.4
		D459H	W <b>S</b> L <b>L</b> D <b>K</b> F <b>E</b> W	W <b>S</b> L <b>L</b> H <b>K</b> F <b>E</b> W	W <b>E</b> R <b>L</b> E <b>Y</b> D <b>L</b> L	104	0.4
		R347W	HFT <b>T</b> RYITE	HFT <b>W</b> YITE	I <b>E</b> E <b>E</b> E <b>L</b> I <b>L</b> M	115.3	0.4
	<b>EHMT2</b>	A635T	A <b>L</b> E <b>K</b> A <b>L</b> V <b>I</b> Q	A <b>L</b> E <b>K</b> T <b>L</b> V <b>I</b> Q	F <b>T</b> T <b>W</b> I <b>T</b> E <b>W</b>	5.3	0.025
HLA-B5801	<b>ANO8</b>	R105C	HRH <b>T</b> RAYAF	HRH <b>C</b> AYAF	W <b>S</b> L <b>L</b> H <b>K</b> F <b>E</b> W	16	0.1
	<b>RAB10</b>	F10L	Y <b>D</b> L <b>L</b> F <b>K</b> L <b>L</b> L	Y <b>D</b> L <b>L</b> L <b>K</b> L <b>L</b> L	R <b>G</b> T <b>G</b> H <b>F</b> T <b>T</b> W	34.2	0.175
	<b>EHMT2</b>	A635T	A <b>L</b> E <b>K</b> A <b>L</b> V <b>I</b> Q	A <b>L</b> E <b>K</b> T <b>L</b> V <b>I</b> Q	K <b>A</b> L <b>E</b> K <b>T</b> L <b>V</b> I	40.7	0.2
	<b>RAB10</b>	F10L	Y <b>D</b> L <b>L</b> F <b>K</b> L <b>L</b> L	Y <b>D</b> L <b>L</b> L <b>K</b> L <b>L</b> L	C <b>A</b> Y <b>A</b> F <b>T</b> A <b>T</b> Y	44.9	0.25
	A635T	A <b>L</b> E <b>K</b> A <b>L</b> V <b>I</b> Q	A <b>L</b> E <b>K</b> T <b>L</b> V <b>I</b> Q	L <b>L</b> L <b>K</b> L <b>L</b> L <b>R</b> W	42.3	0.25	
				K <b>T</b> L <b>V</b> I <b>Q</b> L <b>N</b> L	64.6	0.3	

favorable prognosis, including improved relapse-free and overall survival. These findings were confirmed in several cohorts of patients, including validation cohorts from TCGA and METABRIC databases.

Expression of HLA-A and HLA-B correlated strongly with T cell activation, using *GZMA*, *GZMB*, and *PRF1* as surrogates. When compared with other immune signatures like the cytotoxic T signature, the expanded immune gene signature, and the IFN gamma signature,<sup>19,20</sup> the expression of these two

genes, predicted prognosis with similar predictive accuracy. In addition, when HLA-A and HLA-B were added to the existing signatures the predictive value improved, demonstrating the importance of antigen presentation in the activation of the immune response. Between the different breast cancer subtypes, the basal-like subtype was the one with the greatest association with activation of T cells, the highest magnitude of association with prognosis and was the subtype with the highest expression of HLA-A and HLA-B. The importance of



**Figure 4.** Prognosis of HLA-A and HLA-B based on immune signatures. A. Correlation between HLA-A and HLA-B expression and the expression of T cell activated genes (GZMA, GZMB, and PRF1). B. HLA-A and HLA-B expression in different breast cancer subtypes. C. The table shows the hazard ratio and the Kaplan-Meier  $p$  value, as described in material and methods, for HLA-A and HLA-B, and three immune signatures previously described for relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS), in basal and HER2+ breast tumors. D. Inclusion of HLA-A and HLA-B in previously validated signatures. Those signatures which predictive capacity improved with the inclusion of HLA-A and HLA-B are highlighted in green.

immunotherapy in basal breast cancer has recently been highlighted by positive results from the combination of immunomodulators, like atezolizumab, with chemotherapy.<sup>21</sup>

Presence of TILs has been clearly associated with favorable outcome and response to therapy.<sup>13-15</sup> In this line, our study also identifies patients with good prognosis. Unfortunately, the available datasets do not provide information to compare our gene signature with the presence of TILs and, therefore, future prospective studies will be necessary.

As antigen presentation defects can influence response to checkpoint inhibitors, we also explored the importance of mutations in HLA-A and HLA-B in relation to patient outcome. For instance, truncating mutations in the gene encoding the antigen-presenting protein beta-2-microglobulin (B2M) have been described. These lead to a loss of expression MHC-I and reduced response to PD(L)-1 blockade.<sup>18</sup> However, in our study, no significant association with prognosis was found, probably due to the number of mutations in HLA-A and HLA-B being very low.

In summary, expression of HLA-A and HLA-B is associated with T cell activation and identifies immune activated, basal-like breast cancers with favorable prognosis. These findings support the importance of antigen presentation and recognition as an initial step in the activation of the immune system. While the reported associations do not imply causality, they do generate hypotheses that can be tested in the

laboratory as well as in the clinical setting. Such additional research is warranted especially to try to identify patients most likely to respond to immunotherapy.

## Material and methods

### Exploratory cohort

The exploratory cohort was set up by using samples from the KM Plotter Online Tool (<http://www.kmplot.com>).<sup>22</sup> This publicly available database allows the investigation of the relationship between gene expression and patient outcome including overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) in 879 basal-like, 2504 luminal A, 1425 luminal B and 335 HER2+ samples from breast cancer patients (as of January 2019). Patients were divided according to the best cutoff values of the gene expression (lowest  $p$  value) into “high” vs. “low” expression. RFS was defined as the time from diagnosis to the first recurrence, and OS as the time from diagnosis to patient death. The median follow-up for RFS was 68 months and for OS was 80 months.

### Confirmatory cohorts

Two validation cohorts were established. The first cohort was (cohort 1) set up by using samples from the METABRIC

project.<sup>23</sup> The entire dataset, containing 1988 patients, was downloaded from the European Genome-Phenome Archive (EGA). Median follow up for OS was 116.45 months. The raw data were re-processed to reduce the batch effects present in the original analysis. Data were summarized using the beadarray package<sup>24</sup> in the R statistical environment ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Annotation was performed using the Illumina HumanV3 database from Bioconductor. Unmapped probes were removed from the dataset ( $n = 319$ ) and quantile normalization was performed across the entire dataset using the preprocess Core package.<sup>25</sup> In cases where multiple probes were linked to a single gene, the probe with the highest dynamic range was selected to represent the gene.

The second cohort (cohort 2) was obtained from The Cancer Genome Atlas dataset. Data were downloaded from the GDC data portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Median follow up for OS was 28.83 months. For analysis, the pre-processed level 3 data were used. Individual sample files were merged using the plyr R package as described previously.<sup>26</sup>

### Definition of molecular subtypes

Breast cancer intrinsic subtypes were designated according to the 2017 St Gallen guidelines.<sup>27</sup> In brief, ER negative and HER2 negative patients were designated as basal, HER2 positive ER negative patients were designated as HER2-enriched, and ER positive, HER2 negative and MKI67 low patients as Luminal A. All remaining ER positive patients were designated as Luminal B patients. Instead of using immunohistochemical results (which were available for only a proportion of patients), designation of molecular subtype was made using the gene-array or RNAseq derived gene expression.

### Functional analysis of HLA-A and -B associated mutations

We used upregulated HLA samples described previously (TCGA database) to explore the pattern of mutations associated with the upregulation of HLA-A and HLA-B genes. The mutated selected genes had a correlation  $p$  value  $< .001$ . The function of the identified genes was analyzed using the gene ontology biological process classification from the Ensembl dataset (<https://www.ensembl.org/index.html>).

### Identification of neopeptides

For each mutation in the dataset, we constructed a 9-mer peptide. The substitution position was located in the middle of the peptide, at position 5. Two sequences were constructed per mutation, one for the wild-type and the other for the mutated sequence. Both sequences were in FASTA format. The mutated peptide sequences were used as input in the NetMHC 4.0 epitope-HLA prediction.<sup>28</sup> The results for each HLA were stored in tab-delimited files. Peptides were defined as neopeptides for a certain HLA molecule when the mutated sequence was predicted to bind. Binding affinity was defined in nanoMolar units, and % Rank predicted affinity compared to a set of 400,000 random natural peptides. Those peptides with predicted % Rank  $< 2$  were classified as binders. Peptides with % Rank  $> 2$  were filtered out.

### Prognosis of validated immune signatures

We used three immune signatures previously described (IFN gamma signature, expanded immune gene signature, and Cytotoxic T lymphocyte (CTL) level signature<sup>19,20</sup> to compare predictive value in relation to HLA-A and HLA-B expression. This comparison was performed using data from the KM Plotter Online Tool (<http://www.kmplot.com>) as described previously.<sup>23</sup>

### Statistical analysis

Cox proportional hazards regression was computed to explore the association between gene expression and outcomes. Kaplan-Meier plots were drawn to visualize the survival differences. Correlation between continuous variables was computed using Spearman correlation. Mutational status and gene expression were compared using Mann-Whitney test. Multiple genes were combined into a signature by using their mean expression. Statistical significance was defined as  $p < .05$ . Meta-analytical was performed using the inverse variance method (DerSimonian-Laird estimator for  $\tau^2$ ). Random effects model and Q test were used to evaluate subgroup differences. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$  and \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### Authors' Contribution

AO conceived the study and did the original design of the experiments. MN, CN searched the data and JP, MN, CN, GB, and FA performed the analysis. AO, AP, EA, EMGM, and GB wrote the manuscript. All authors reviewed, included modifications and approved the final version of the manuscript.

### Disclosure of potential conflict of interest

AO receives research funding from Entrechem and travel expenses from Merck.

### Funding

This work has been supported by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), ACEPAIN; Diputación de Albacete, CIBERONC and CRIS Cancer Foundation (to A. Ocaña). Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (BFU2015-71371-R), the Instituto de Salud Carlos III through the Spanish Cancer Centers Network Program (RD12/0036/0003) and CIBERONC, the scientific foundation of the AECC and the CRIS Foundation (to A. Pandiella). The work carried out in our laboratories receive support from the European Community through the regional development funding program (FEDER). E.M. Galan-Moya is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds); Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer [Proyectos]; Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación [BFU2015-71371-R]; Universidad de Castilla-La Mancha [Implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014)].

### ORCID

Balázs Gyórfy  <http://orcid.org/0000-0002-5772-3766>



## References

- Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018 Mar 23;359(6382):1350–1355. Epub 2018 Mar 22. doi:10.1126/science.aar4060.
- Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:463–482. doi:10.1038/nrclinonc.2017.43.
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*. 2017;168:707–723. doi:10.1016/j.cell.2017.01.017.
- Prendergast GC, Mondal A, Dey S, Laury-Kleintop LD, Muller AJ. Inflammatory reprogramming with IDO1 inhibitors: turning immunologically unresponsive ‘cold’ tumors ‘hot’. *Trends Cancer*. 2018;4:38–58. doi:10.1016/j.trecan.2017.11.005.
- Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, Stephens PJ, Daniels GA, Kurzrock R. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:2598–2608. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0386.
- Brown SD, Warren RL, Gibb EA, Martin SD, Spinelli JJ, Nelson BH, Holt RA. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res*. 2014;24:743–750. doi:10.1101/gr.165985.113.
- Kosaloglu-Yalcin Z, Lanka M, Frenzen A. Predicting T cell recognition of MHC class I restricted neopeptides. *Oncoimmunology*. 2018;7(11):e1492508.
- Bethune MT, Li XH, Yu J, McLaughlin J, Cheng D, Mathis C, Moreno BH, Woods K, Knights AJ, Garcia-Diaz A, et al. Isolation and characterization of NY-ESO-1-specific T cell receptors restricted on various MHC molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:E10702–e10711. doi:10.1073/pnas.1810653115.
- Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1172–1187. doi:10.1093/jnci/djt184.
- Chowell D, Morris LGT. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science*. 2018 Feb 2;359(6375):582–587. Epub 2017 Dec 7. doi:10.1126/science.aao4572.
- Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, Wölfel T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:16013–16018. doi:10.1073/pnas.050090102.
- Heemskerk B, Kvistborg P, Schumacher TN. The cancer antigenome. *Embo J*. 2013;32:194–203. doi:10.1038/emboj.2012.333.
- Carbognin L, Pilotto S, Nortilli R, Brunelli M, Nottegar A, Sperduti I, Giannarelli D, Bria E, Tortora G. Predictive and prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes for early breast cancer according to disease subtypes: sensitivity analysis of randomized trials in adjuvant and neoadjuvant setting. *Oncologist*. 2016 Mar;21(3):283–291. doi:10.1634/theoncologist.2015-0307.
- Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, Kataja V, Desmedt C, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25:1544–1550. doi:10.1093/annonc/mdu112.
- Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, Van Den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259–271. doi:10.1093/annonc/mdu450.
- Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, Martino S, Wang M, Jones VE, Saphner TJ, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014;32:2959–2966. doi:10.1200/JCO.2013.55.0491.
- Malissen M, Malissen B, Jordan BR. Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:893–897. doi:10.1073/pnas.79.3.893.
- Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2016;375:819–829. doi:10.1056/NEJMoa1604958.
- Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, Li Z, Traugh N, Bu X, Li B, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nat Med*. 2018;24:1550–1558. doi:10.1038/s41591-018-0136-1.
- Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, Albright A, Cheng JD, Kang SP, Shankaran V, et al. IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127:2930–2940. doi:10.1172/JCI91190.
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im S-A, Shaw Wright G, et al. Atezolizumab and Nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2018;379:2108–2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615.
- Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123:725–731. doi:10.1007/s10549-009-0674-9.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486:346–352. doi:10.1038/nature10983.
- Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, Tavare S. beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics*. 2007;23:2183–2184. doi:10.1093/bioinformatics/btm311.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19:185–193. doi:10.1093/bioinformatics/19.2.185.
- Mihaly Z, Kormos M, Lanczky A, Dank M, Budczies J, Szász MA, Györfy B. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140:219–232. doi:10.1007/s10549-013-2622-y.
- Curigliano G, Burstein HJ, PW E, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, Colleoni M, Regan MM, Piccart-Gebhart M, Senn H-J, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen international expert consensus conference on the primary therapy of early breast cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017;28:1700–1712. doi:10.1093/annonc/mdx308.
- Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016;32:511–517. doi:10.1093/bioinformatics/btv639.

## RESEARCH ARTICLE

# Genetic mutational status of genes regulating epigenetics: Role of the histone methyltransferase *KMT2D* in triple negative breast tumors

Sara Morcillo-Garcia<sup>1,2</sup>, Maria del Mar Noblejas-Lopez<sup>1,2</sup>, Cristina Nieto-Jimenez<sup>1</sup>, Javier Perez-Peña<sup>1,2</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1,2</sup>, Balázs Gyórfy<sup>3,4</sup>, Eitan Amir<sup>5</sup>, Atanasio Pandiella<sup>6</sup>, Eva M. Galan-Moya<sup>1,2</sup>, Alberto Ocana<sup>1,2,7\*</sup>

**1** Translational Research Unit, Albacete University Hospital, and CIBERONC, Albacete, Spain, **2** Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla La Mancha, Albacete, Spain, **3** Semmelweis University 2nd Department, of Pediatrics, Budapest, Hungary, **4** MTA TTK Lendület Cancer Biomarker Research Group, Budapest, Hungary, **5** Division of Medical Oncology and Hematology, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Toronto, Canada, **6** Cancer Research Center, CSIC-IBSAL and CIBERONC, Salamanca, Spain, **7** Hospital Clínico Universitario San Carlos and Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

\* [albertoo@sescam.jccm.es](mailto:albertoo@sescam.jccm.es)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Morcillo-Garcia S, Noblejas-Lopez MdM, Nieto-Jimenez C, Perez-Peña J, Nuncia-Cantarero M, Gyórfy B, et al. (2019) Genetic mutational status of genes regulating epigenetics: Role of the histone methyltransferase *KMT2D* in triple negative breast tumors. PLoS ONE 14(4): e0209134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134>

**Editor:** Jumana Yousuf Al-Aama, King Abdulaziz University Hospital, SAUDI ARABIA

**Received:** November 27, 2018

**Accepted:** March 4, 2019

**Published:** April 16, 2019

**Copyright:** © 2019 Morcillo-Garcia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Data used in this study is from the Breast Cancer METABRIC study (EGAS00000000083), contained at cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>). Data may directly be found here: [https://www.cbioportal.org/study?id=brca\\_metabric](https://www.cbioportal.org/study?id=brca_metabric).

**Funding:** Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), ACEPAIN; Diputación de Albacete and CRIS Cancer Foundation (to AO). Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (BFU2015-

## Abstract

### Purpose

Epigenetic regulating proteins like histone methyltransferases produce variations in several functions, some of them associated with the generation of oncogenic processes. Mutations of genes involved in these functions have been recently associated with cancer, and strategies to modulate their activity are currently in clinical development.

### Methods

By using data extracted from the METABRIC study, we searched for mutated genes linked with detrimental outcome in invasive breast carcinoma (n = 772). Then, we used downstream signatures for each mutated gene to associate that signature with clinical prognosis using the online tool “Genotype-2-Outcome” (<http://www.g-2-o.com>). Next, we performed functional annotation analyses to classify genes by functions, and focused on those associated with the epigenetic machinery.

### Results

We identified *KMT2D*, *SETD1A* and *SETD2*, included in the lysine methyltransferase activity function, as linked with poor prognosis in invasive breast cancer. *KMT2D* which codes for a histone methyltransferase that acts as a transcriptional regulator was mutated in 6% of triple negative breast tumors and found to be linked to poor survival. Genes regulated by *KMT2D* included *RAC3*, *KRT23*, or *KRT14*, among others, which are involved in cell communication and signal transduction. Finally, low expression of *KMT2D* at the transcriptomic

71371-R), the Instituto de Salud Carlos III through the Spanish Cancer Centers Network Program (RD12/0036/0003) and CIBERONC, the scientific foundation of the AECC and the CRIS Foundation (to AP). The work carried out in our laboratories receive support from the European Community through the regional development funding program (FEDER). E.M. Galan-Moya is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (co-funded by the European Commission/FSE funds).

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

level, which mirror what happens when *KMT2D* is mutated and functionally inactive, confirmed its prognostic value.

## Conclusion

In the present work, we describe epigenetic modulating genes which are found to be mutated in breast cancer. We identify the histone methyltransferase *KMT2D*, which is mutated in 6% of triple negative tumors and linked with poor survival.

## Introduction

Advances in the analyses of the genomic landscape of human cancers have permitted the identification of different molecular alterations, including mutations, copy number variations, or gene rearrangements, which may be linked with the genesis and maintenance of tumors [1,2]. Unfortunately, for most of the identified molecular alterations, limited druggable opportunities exist [1,2]. Very well-known exceptions include inhibition of protein kinase activity, when that alteration affects a kinase [2]. This has been the case for agents targeting mutated or amplified protein kinases, such as EGFR or HER2 in lung and breast cancers [3–5]. In a similar manner, chromosomal rearrangements can produce fusion proteins, like Trk fusion proteins, with kinase activity amenable for pharmacological inhibition [6,7].

Changes at the genome not directly produced by an alteration of the nucleotide sequence of the DNA are known as epigenetic modifications [8]. Alterations in proteins involved in epigenetic regulation can affect genetic programs that can in turn impact on several cellular functions. Ultimately, such genomic alterations can translate into different diseases, from cancer to neurological alterations or aging disorders, among others [8,9]. Epigenetic regulating proteins include enzymes involved in histone modifications, histone proteins, chromatin remodeling complexes or DNA methylation enzymes [8]. Mutations at genes coding for proteins involved in several of these functions have been already described, and some of them have been associated with cancer [10]. Therefore, inhibition of epigenetic proteins can have a wide effect impacting on the expression of multiple genes, affecting multiple pathways at the same time [10]. In this context, agents that target epigenetic enzymes have been recently described and are currently in clinical development [11]. An example is *KMT2D* that codes for a histone methyltransferase that methylates the Lys-4 position of histone H3, and is involved in the regulation of several transcription factors, like the estrogen receptor (ER) or FOXA1, among others [12,13]. Although not very well known, *KMT2D* can act in some circumstances as a tumor suppressor gene maintaining the expression of relevant proteins involved in genomic stability [14].

In this study, we evaluated the mutational status of genes involved in epigenetic control in breast cancer, identifying *KMT2D* as mutated in around 6% of triple negative tumors and linked with a particular detrimental prognosis.

## Material and methods

### Identification of breast cancer mutated genes

Data was extracted from the Breast Cancer METABRIC study (EGAS00000000083), contained at cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) [15]. This database contains cDNA microarray profiling of about 2000 samples (n = 2509). Briefly, METABRIC project aimed to classify breast

tumors into subcategories depending on molecular signatures. To do so, DNA and RNA were isolated from samples and hybridized to the Affymetrix SNP 6.0 and Illumina HT-12 v3 platforms for genomic and transcriptional profiling, respectively. First, we searched for mutated genes in those samples from Invasive Breast Carcinoma patients ( $n = 772$ ), including luminal A, luminal B, HER2+ and basal-like. Genes that were mutated in more than 2.5% of the patients were identified. The frequency of mutations was independently confirmed using the TCGA database ( $n = 818$ ).

### Functional analyses

For the functional annotation analysis of the set of mutated genes, the gene list enrichment analyses tool DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/>) was used. To do so, genes with a mutation frequency greater than 2.5% and linked with poor prognosis were selected (S1 Table).

For the functional analysis of the KMT2D-associated gene signature (S2 Table), the online Enrichr tool was used (<http://www.amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). An adjusted  $p$ -value  $< 0.05$  was applied to select enriched gene-sets. Genes were separated into overexpressed and underexpressed and "KEGG 2015" option was chosen for the analyses and the calculation of the "combined score".

### Outcome analyses

To evaluate the relationship between the presence of mutated genes and patient clinical outcome, the Genotype-2-Outcome online tool (<http://www.g-2-o.com>) [16] was used. This publicly available database allows the evaluation of clinical outcome for all breast cancer subtypes (All, Triple Negative Breast Cancer, Luminal A, Luminal B and HER2+) by exploring the association with prognosis of a specific transcriptomic signature associated with that mutation. In brief, the expression of each gene is compared between the mutated and wild type patients and those genes reaching significance are designated as the signature for the mutation. Then, the mean expression of all these genes is computed and is used as a surrogate of mutational status. The continuous spectra of the signature is used to define "high" and "low" expression cohorts, and these are compared using a Cox proportional hazards regression analysis. In the survival analysis, the median expression is used as a cutoff to discriminate "high" and "low". The prognostic endpoint was relapse-free survival.

To evaluate the relationship between the expression of the genes and patient clinical prognosis, the KM Plotter Online Tool (<http://www.kmplot.com>) [17,18] was used. This database permits the evaluation of overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) in basal-like, luminal A, luminal B, HER2+ and triple negative breast cancers.

For both outcome analyses, patients were separated according to median values. Patients above the threshold were considered to have a "high" expression while patients below the threshold were defined as those with "low" expression.

### Evaluation of KMT2D mutations

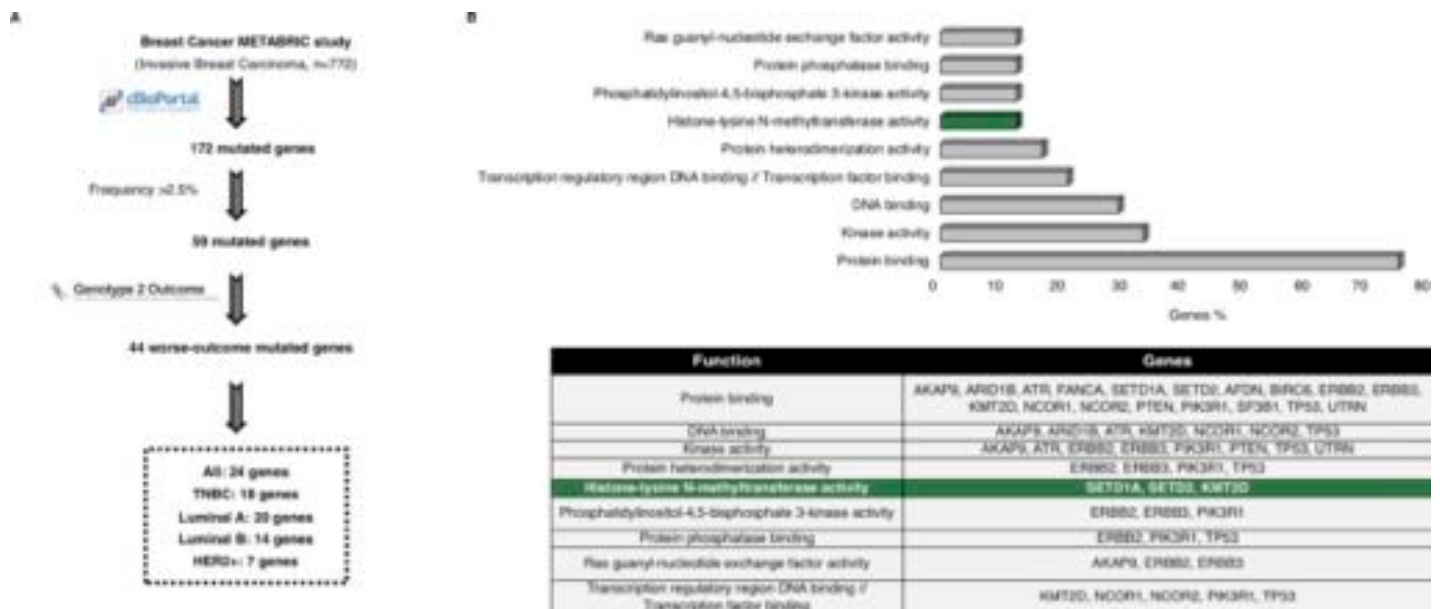
Data contained at cBioportal (<http://www.cbioportal.org>) was used to identify mutations in *KMT2D*. Mutation Assessor (<http://www.mutationassessor.org>), SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) databases were used to evaluate the effect of the mutation on *KMT2D* functionality.

### Results

By using the METABRIC database, we identified 172 mutated genes in the analyses of the 772 samples from invasive breast tumors. We found that 59 out of the 172 genes were mutated in more than 2.5% of the samples. Next, we evaluated the impact of these genes on patient outcome using the online tool Genotype-2-Outcome (<http://www.G-2-O.com/>)[16] (Fig 1A). This application identifies the transcriptomic signature associated with the presence of the mutation in patients. Using this approach, 44 of the mutated genes had an associated signature linked to detrimental prognosis in breast cancer (Fig 1A). S1 Table shows the list of all mutated genes, including those associated with outcome and those not.

To get insights into the biological function of the mutated genes, we performed a functional annotation analysis. Protein binding, kinase activity, DNA binding and transcription factor binding were among the identified functions which grouped more genes (Fig 1B). Then, the mutational frequency of the identified genes for all breast cancer subtypes was studied. Mutations in some of the genes have been widely described in breast cancer, as is the case for TP53, in luminal and HER2+ tumors (Fig 2A). In the case of TNBC, mutated genes displaying higher frequency, more than 8%, included SYNE1, CDH1 and DNAH11 (Fig 2A). In HER2+ disease, PIK3CA was mutated in more than 40% of tumors. Of note, mutated genes found in TNBC tumors showed a broader range of functions than the other subtypes (Fig 2B).

Because epigenetic enzymes are currently under evaluation as druggable targets, we focused on genes that had this function. Therefore, we selected the three genes included in the functional analyses under the “Histone-lysine N-methyltransferase activity” function, KMT2D, SETD2 and SETD1A, (Fig 1B). Next, we confirmed the presence of these mutations in the different breast cancer subtypes, using data contained at TCGA (Table 1). According to TCGA data, mutations of KMT2D were observed in 6% of TNBC and mutations of SETD2 in 1.2%, confirming the data obtained with METABRIC. Unfortunately, the data contained at



**Fig 1. Whole genome mutational profiling and identification of histone-lysine methyltransferase activity as deregulated in breast cancer.** A. Flow chart of the study, in which the METABRIC dataset was used to identify breast cancer mutated genes associated with worse outcome. B. Functional analyses of the mutated genes associated with worse outcome, using DAVID Bioinformatics Resources 6.8 tool, and found in more than 2.5% of the breast cancer samples analyzed. The table shows the list of the mutated genes contained in each function.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.g001>



METABRIC does not divide tumors by subtype. The presence of mutation in the other breast cancer subtypes was not confirmed or was too low compared to the percentage found in METABRIC. The proportion of *SETD1A* mutations was not confirmed in TCGA for any of the subtypes (Table 1). Next, we aimed to further explore the impact of the mutations of these two genes in patient prognosis, by exploring the effect of their associated transcriptomic signature in breast cancer (All subtypes). The complete list of deregulated genes included in the *KMT2D* associated transcriptomic signature is shown in S2 Table. S3 Table and S4 Table shows the transcriptomic signatures for *SET1DA* and *SETD2*, respectively. *KMT2D* transcriptomic signature was linked with detrimental outcome (HR 0.62 CI: 0.56–0.69; log rank  $p = 0$ ), as well as *SETD1A* (HR 0.66 CI: 0.59–0.74; logrank  $p = 7.6E-14$ ) and *SETD2* (HR 0.69, CI: 0.62–0.77; logrank  $p = 1.8e-11$ ) transcriptomic signatures (Fig 3A).

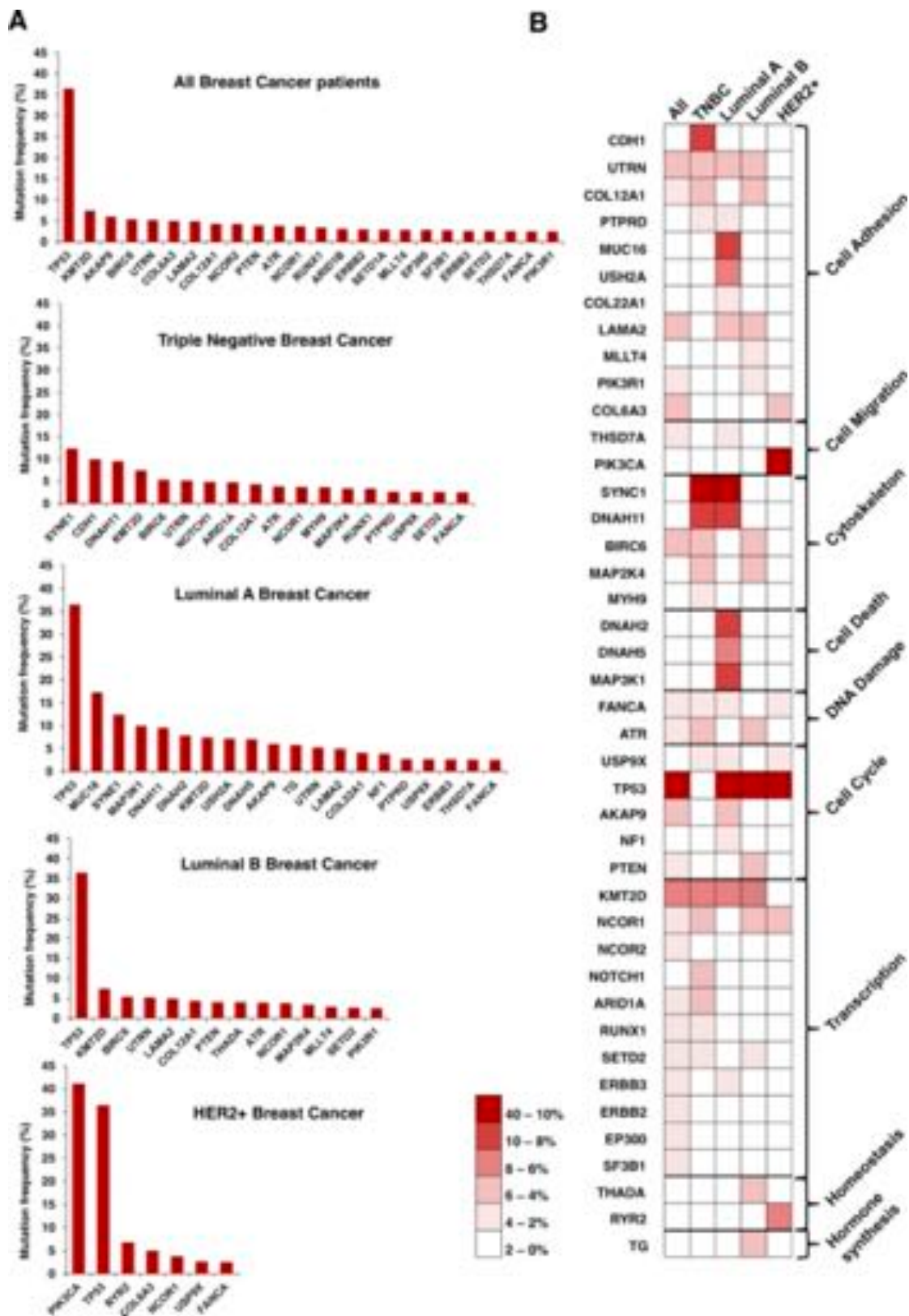
As the presence of *KMT2D* and *SETD2* mutations were consistent in TNBC, we next explored if *KMT2D* and *SETD2* mutational signatures were associated with detrimental prognosis in this specific tumor subtype. Notably, the presence of the associated transcriptomic signatures for both, *KMT2D* and *SETD2*, were associated with poor prognosis (HR 0.58 CI: 0.45–0.74; log rank  $p = 1.9e-05$  and HR 0.55 CI: 0.43–0.71; log rank  $p = 4.2e-06$ ; respectively) (Fig 3B). Next we explored if treatment with chemotherapy influenced outcome in patients harboring the described signatures. As can be seen in S1A Fig for all breast patients and in S1B Fig for triple negative patients, administration of chemotherapy did not influence outcome for *KMT2D* and *SETD1A*. However for *SETD2* a slightly effect was observed.

From here, we focused on *KMT2D*, as it was the most prevalent mutated gene in both datasets and was strongly associated with poor outcome. *KMT2D* is a histone methyltransferase that acts as a transcriptional regulator. The functions of the transcriptomic signature of *KMT2D*, determined with the online tool Enrichr, are displayed in Fig 4. Most down-regulated genes were included in the cell communication function, followed by tyrosine metabolism or extracellular matrix receptor interaction (S2 Table). Genes that code for Keratins, *KRT23* or *KRT14*, were among the most relevant genes included in the cell communication function (Fig 4). The most relevant upregulated gene included the GTPase *RAC3*, that belongs to the RAS family of small GTPases involved in cell proliferation (S2 Table and Fig 4) [19].

Last, we explored the functional consequences of the mutations present in *KMT2D* in the samples of the METABRIC database. To identify these mutations, we used the online tool cBioportal (Fig 5A). Missense mutations were scattered along the full length of the protein, and were the most abundant molecular alterations, followed by truncating mutations (Fig 5B). The functional impact of all these different mutations, evaluated with three different databases (Mutation Assessor, SIFT and PolyPhen-2), are displayed in Fig 5C. As shown, between 40–55% of *KMT2D* mutations had a functional impact. This indicated that those mutations lead to an abnormal protein, unable to participate in their normal function, mimicking a lack of expression of the gene. To confirm this hypothesis, we decided to explore if a low expression level of this gene could recapitulate the outcome observed at a mutational level, when we explored the effect of mutated *KMT2D*. Using the online tool KMplotter, that links the transcriptional expression of a gene with patient outcome [18], we found that low transcriptomic levels of *KMT2D* were associated with detrimental prognosis (relapse free survival) in all breast tumors (HR 0.64 CI: 0.55–0.79; log rank  $p = 2.4e-08$ ) (Fig 5D), in addition to the triple negative subtype (HR 0.71 CI: 0.51–0.98; log rank  $p = 0.035$ ) (Fig 5E).

## Discussion

In the present article we report the identification of genes that are mutated in breast cancer and associated with detrimental outcome. After functional analysis of the identified genes, we



**Fig 2. Mutational profile by breast cancer subtype, and association with biological functions.** A. Graphs displayed the mutation frequency of those genes mutated in more than 2.5% of patients for all and each breast cancer subtype. B. Heat map of the mutation frequency and the functions of the identified genes for each breast cancer subtypes. The percentage of mutated cases is displayed in the legend.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.g002>

Table 1. Proportion of mutations in the TCGA and METABRIC databases.

Breast cancer subtype	Database	KMT2D	SETD2	SETD1A
All	METABRIC	7,43%	2,62%	2,91%
TNBC	TCGA	6,00%	1,2%	-
Luminal A	TCGA	0,32%	-	-
Luminal B	TCGA	0,81%	0,00%	-
HER2+	TCGA	-	-	-

Proportion of mutations in *KMT2D*, *SETD2* and *SETD1A* using data from the METABRIC and TCGA studies contained in cBioportal. METABRIC does not provide data by breast cancer subtype.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.t001>

focused on the “Histone-lysine N-methyltransferase activity” function and found that the histone methyltransferase gene *KMT2D* was mutated in around 6% of the TNBCs samples evaluated; in addition to be associated with poor prognosis in this breast cancer subtype.

*KMT2D* is a histone methyltransferase that methylates the Lys-4 position of the histone H3 [13]. The codified protein belongs to a large protein complex termed ASCOM, which is one of the transcriptional regulators of the estrogen receptor genes [12,13].

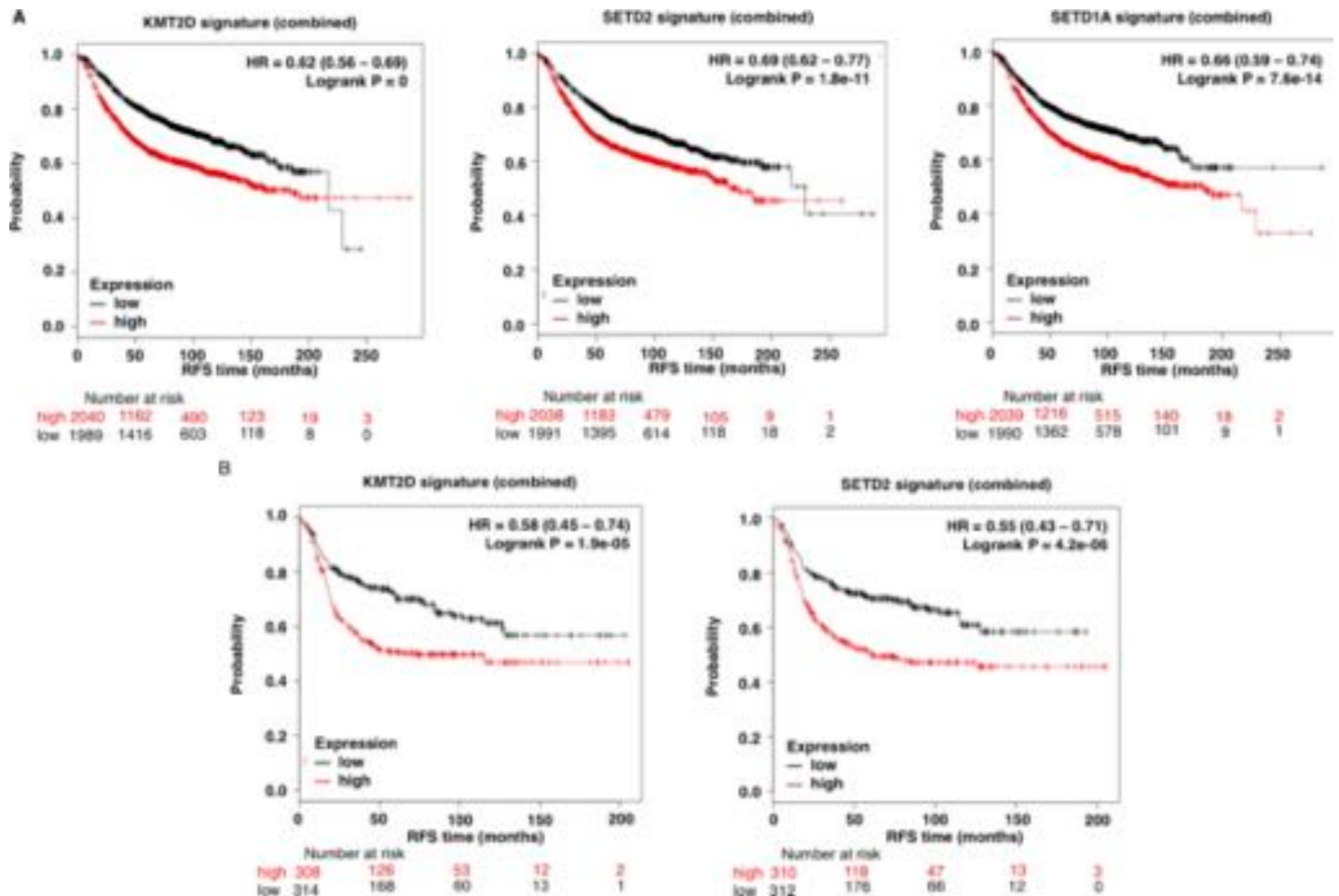
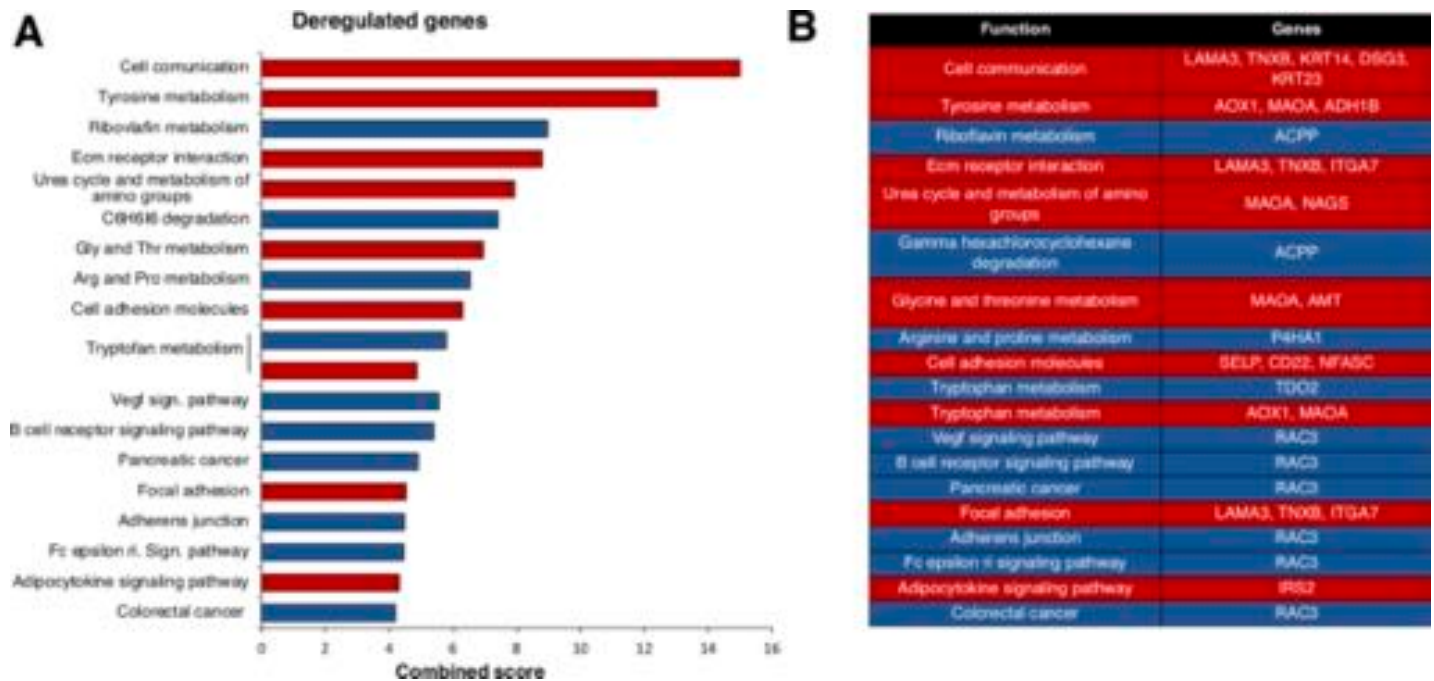


Fig 3. *KMT2D*, *SETD2* and *SETD1A* mutational signature and clinical outcome. A. Association of *KMT2D*, *SETD2*, and *SETD1A* mutational signature with patient outcome in all breast tumors. B. Association of *KMT2D* and *SETD2* mutational signatures with prognosis in triple negative breast tumors. The online tool Genotype-2-Outcome was used for both analyses.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.g003>





**Fig 4. Functional analysis of deregulated genes included in the KMT2D mutated signature.** A. Percentage of deregulated genes included in the KMT2D mutated signature by biological function. Overexpressed genes are displayed in blue and down-expressed genes in red. For functional annotation analysis, the online tool Enrichr was used as described in material and methods. B. Deregulated genes included in each function.

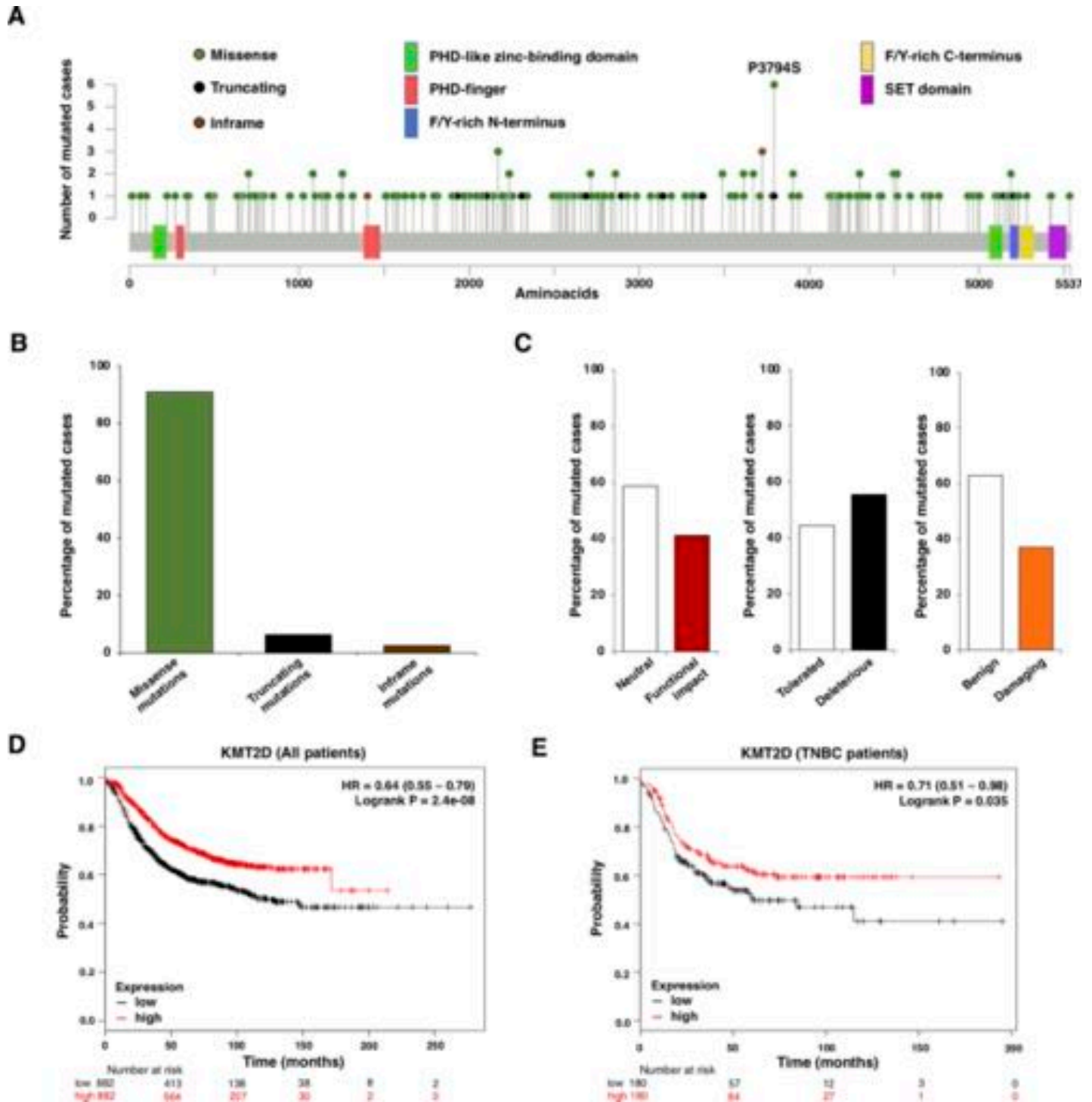
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.g004>

KMT2D mutations have been associated with the development of different tumors, including small cell lung cancer [13], esophageal squamous cell carcinoma, and large B-cell lymphoma [13]. Although there are many other tumors where mutations in this gene have been described [13,20], limited information about the presence of this mutation has been reported in breast cancer.

Recent data suggest that KMT2D is involved in the recruitment and activation of relevant breast cancer genes including *FOXA1*, *PBX1*, and *ER* [12]. As described in the present article and other reports, most of the mutations in KMT2D are frameshift and nonsense mutations in the SET and PHD domains, respectively [12]. Most of the described mutations result in the protein loss or in a reduction of the methyltransferase activity [21]. Therefore, this can produce defective enhancer regulation and, subsequently, modifications in the transcription of several genes or increase in genomic instability [8,14]. This is demonstrated in our study by the transcriptomic signature associated with the gene mutation, which will be discussed later, particularly with the upregulation of *RAC3*. Of note, KMT2D displays different effects depending on the cellular context, due to the recruitment of different transcription factors [13].

When evaluating the transcriptomic signature linked to KMT2D mutations, we found that *RAC3* was one of the most significantly upregulated transcripts. This transcript codes for a GTPase which belongs to the RAS superfamily of small GTP-binding proteins, and it has been linked with the pathophysiology of many solid tumors, including breast cancer [19,22,23]. In breast cancer *RAC3* regulates invasion and migration participating in the metastatic process [19].

Finally, we confirmed that the expression level of the KMT2D gene was associated with clinical outcome in a similar manner as we observed for the presence of the gene mutations, which mostly produce a reduction or loss of protein expression or a decrease in its activity. This result indirectly confirms the robustness of the mutational gene signature in relation to outcome.



**Fig 5. Assessment of mutations at *KMT2D*.** A. Diagram showing each aminoacid (aa) which can be found to be mutated in the *KMT2D* gene. B. Type of mutations from the included cases. C. Functional impact of *KMT2D* mutations in the included cases. D. Relapse free survival (RFS) of breast cancer patients based on the transcriptomic expression of *KMT2D*. Low expression is associated with poor outcome. E. Relapse free survival (RFS) of triple negative breast cancer patients based on the transcriptomic expression of *KMT2D*. KM plotter online tool was used for these prognosis analyses. Low expression is associated with poor outcome.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209134.g005>

In conclusion, in the present work, we identify that the histone methyltransferase gene *KMT2D* is mutated in a number of TNBC patients and associated with detrimental outcome in TNBC. Therefore, modulation of the expression or activity of downstream genes, or *KMT2D* itself, might have relevant consequences from a therapeutic point of view.

## Supporting information

**S1 Fig. *KMT2D*, *SETD2* and *SETD1A* mutational signature and clinical outcome in patients treated with chemotherapy.** A. all breast cancer patients. B. Triple negative breast cancer patients.

(TIFF)

**S1 Table. Genes mutated in more than 2.5% of cases using the METABRIC dataset.** Genes with worse outcome for each cancer subtype are shown in the table.

(TIFF)

**S2 Table. Deregulated genes contained in the transcriptomic signature linked to *KMT2D* mutation.** Genes found to be upregulated or downregulated in the *KMT2D* mutational signature. Genotype-2-Outcome database was used for this analysis.

(TIFF)

**S3 Table. Deregulated genes contained in the transcriptomic signature linked to *SETD1A* mutation.** Genes found to be upregulated or downregulated in the *SETD1A* mutational signature. Genotype-2-Outcome database was used for this analysis.

(TIFF)

**S4 Table. Deregulated genes contained in the transcriptomic signature linked to *SETD2* mutation.** Genes found to be upregulated or downregulated in the *SETD2* mutational signature. Genotype-2-Outcome database was used for this analysis.

(TIFF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Balázs Gyórfy, Atanasio Pandiella, Alberto Ocana.

**Data curation:** Sara Morcillo-Garcia, Maria del Mar Noblejas-Lopez, Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocana.

**Formal analysis:** Sara Morcillo-Garcia, Maria del Mar Noblejas-Lopez, Cristina Nieto-Jimenez, Javier Perez-Peña, Miriam Nuncia-Cantarero, Balázs Gyórfy, Eva M. Galan-Moya.

**Funding acquisition:** Atanasio Pandiella, Alberto Ocana.

**Investigation:** Sara Morcillo-Garcia, Maria del Mar Noblejas-Lopez, Cristina Nieto-Jimenez, Miriam Nuncia-Cantarero, Eva M. Galan-Moya.

**Methodology:** Sara Morcillo-Garcia, Maria del Mar Noblejas-Lopez, Cristina Nieto-Jimenez, Eva M. Galan-Moya.

**Project administration:** Alberto Ocana.

**Resources:** Balázs Gyórfy.

**Software:** Balázs Gyórfy.

**Supervision:** Balázs Gyórfy, Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocana.

**Writing – original draft:** Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocana.

**Writing – review & editing:** Eitan Amir, Atanasio Pandiella, Eva M. Galan-Moya, Alberto Ocana.


## References

1. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339: 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122> PMID: 23539594
2. Ocana A, Pandiella A. Personalized therapies in the cancer "omics" era. *Mol Cancer*. 2010; 9: 202. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-202> PMID: 20670437
3. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2883. <https://doi.org/10.1056/NEJM200412303512724> PMID: 15625347
4. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364: 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782> PMID: 21639808
5. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344: 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101> PMID: 11248153
6. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990; 247: 1079–1082. PMID: 2408149
7. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1038–1042. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441402> PMID: 11287973
8. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1148–1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067> PMID: 18337604
9. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006; 7: 21–33. <https://doi.org/10.1038/nrg1748> PMID: 16369569
10. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16: 241–263. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.256> PMID: 28280262
11. Ocana A, Nieto-Jimenez C, Pandiella A. BET inhibitors as novel therapeutic agents in breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8: 71285–71291. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19744> PMID: 29050361
12. Toska E, Osmanbeyoglu HU, Castel P, Chan C, Hendrickson RC, Elkabets, et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. *Science*. 2017; 355: 1324–1330. <https://doi.org/10.1126/science.aah6893> PMID: 28336670
13. Froimchuk E, Jang Y, Ge K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene*. 2017; 627: 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.056> PMID: 28669924
14. Kantidakis T, Saponaro M, Mitter R, Horswell S, Kranz A, Boeing S, et al. Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. *Genes Dev*. 2016; 30: 408–420. <https://doi.org/10.1101/gad.275453.115> PMID: 26883360
15. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012; 486: 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983> PMID: 22522925
16. Pongor L, Kormos M, Hatzis C, Pusztai L, Szabo A, Györfy B. A genome-wide approach to link genotype to clinical outcome by utilizing next generation sequencing and gene chip data of 6,697 breast cancer patients. *Genome Med*. 2015; 7: 104. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0228-1> PMID: 26474971
17. Györfy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2013; 8: e82241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082241> PMID: 24367507
18. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 123: 725–731. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0674-9> PMID: 20020197
19. Donnelly SK, Cabrera R, Mao SPH, Christin JR, Wu B, Guo W, et al. Rac3 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling adhesion and matrix degradation. *J Cell Biol*. 2017; 216: 4331–4349. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704048> PMID: 29061650

20. Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013; 502: 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634> PMID: 24132290
21. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med*. 2015; 21: 1190–1198. <https://doi.org/10.1038/nm.3940> PMID: 26366712
22. Lai YJ, Tsai JC, Tseng YT, Wu MS, Liu WS, Lam HI, et al. Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017; 8: 18031–18049. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14949> PMID: 28160553
23. Rosenberg BJ, Gil-Henn H, Mader CC, Halo T, Yin T, Condeelis J, et al. Phosphorylated cortactin recruits Vav2 guanine nucleotide exchange factor to activate Rac3 and promote invadopodial function in invasive breast cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2017; 28: 1347–1360. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0885> PMID: 28356423

## ORIGINAL RESEARCH

# Functional transcriptomic annotation and protein–protein interaction analysis identify EZH2 and UBE2C as key upregulated proteins in ovarian cancer

Sandra Martínez-Canales<sup>1</sup>, Miguel López de Rodas<sup>1</sup>, Miriam Nuncia-Cantarero<sup>1</sup>, Raquel Páez<sup>1</sup>, Eitan Amir<sup>2</sup>, Balázs Györfy<sup>3</sup>, Atanasio Pandiella<sup>4</sup>, Eva María Galán-Moya<sup>1</sup>  & Alberto Ocaña<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Translational Research Unit and Translational Oncology Laboratory, Albacete University Hospital and Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Castilla-La Mancha University (CRIB-UCLM), Albacete, Spain

<sup>2</sup>Division of Medical Oncology and Hematology, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

<sup>3</sup>Semmelweis University 2nd Department of Pediatrics, Budapest, Hungary

<sup>4</sup>Cancer Research Center and CIBERONC, CSIC, Salamanca, Spain

## Keywords

Clinical outcome, druggable proteins, EZH2, Ovarian cancer, protein–protein interaction, UBE2C

## Correspondence

Alberto Ocaña, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Castilla-La Mancha University (CRIB-UCLM), Albacete University Hospital, C/ Almansa 14, 02006 Albacete, Spain.

Tel: 967597100 Ext 37087;

Fax: (+34) 967 599 360;

E-mail: albertoo@sescam.jccm.es

and

Eva María Galán-Moya, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Castilla-La Mancha University (CRIB-UCLM), C/ Almansa 14, 02006 Albacete, Spain.

Tel: 967599200 Ext 2198;

Fax: (+34) 967 599 360;

E-mail: EvaMaria.Galan@uclm.es

## Abstract

Although early stage ovarian cancer is in most cases a curable disease, some patients relapse even with appropriate adjuvant treatment. Therefore, the identification of patient and tumor characteristics to better stratify risk and guide rational drug development is desirable. Using transcriptomic functional annotation followed by protein–protein interacting (PPI) network analyses, we identified functions that were upregulated and associated with detrimental outcome in patients with early stage ovarian cancer. Some of the identified functions included cell cycle, cell division, signal transduction/protein modification, cellular response to extracellular stimuli or transcription regulation, among others. Genes within these functions included *AURKA*, *AURKB*, *CDK1*, *BIRC5*, or *CHEK1* among others. Of note, the histone-lysine N-methyltransferase (*EZH2*) and the ubiquitin-conjugating enzyme *E2C* (*UBE2C*) genes were found to be upregulated and amplified in 10% and 6% of tumors, respectively. Of note, *EZH2* and *UBE2C* were identified as principal interacting proteins of druggable networks. In conclusion, we describe a set of genes overexpressed in ovarian cancer with potential for therapeutic intervention including *EZH2* and *UBE2C*.

## Funding information

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), Diputación de Albacete and CRIS Cancer Foundation (to AO) and the framework agreement between University of Castilla-La Mancha and Albacete Provincial Council (UCLM-Excma. Diputación de Albacete) in support to research activity (to EMGM). We would like to also thanks to the cancer associations AMUMA and ACEPAIN for supporting part of this work. EMGM is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation-Secti (cofunded by the European Commission/FSE funds).



Received: 26 November 2017; Revised: 13 January 2018; Accepted: 26 January 2018

*Cancer Medicine* 2018; 7(5):1896–1907

doi: 10.1002/cam4.1406

## Introduction

Disseminated ovarian cancer is an incurable disease [1]. However, if diagnosed in its early stage, resection and adjuvant chemotherapy can reduce the probability of the tumor to relapse and spread [2]. Unfortunately, some patients with early stage ovarian cancer (mainly stage 1 and 2) are still at high risk of relapse, even after being treated with adequate surgical and adjuvant chemotherapy [2]. In this context, the identification of patients who have high risk of recurrence is desirable as it can influence adjuvant treatment and guide future drug development.

Similar to other cancers, in ovarian cancer, different molecular mechanisms are responsible for cancer initiation and progression. Uncontrolled proliferation, migration, evasion from immunological regulation, or the capacity to generate new vessels are, among others, oncogenic hallmarks of ovarian cancer [3]. Of note, agents that mitigate these functions, such as antimetabolic chemotherapies, DNA damaging agents or anti-angiogenic compounds, have reached the clinical practice [3, 4]. Among agents that target classical deregulated functions such as cell division or proliferation, novel vulnerabilities with potential for therapeutic capacity are under evaluation, including protein modifications or epigenetic events. New drugs targeting the proteasome, ubiquitination, or bromodomains are currently under evaluation in several solid tumors [5].

In this context, it will be desirable to identify biological functions that are characteristically deregulated in ovarian cancer at a transcriptomic and proteomic level. Genomic signatures and protein–protein interacting networks could be used to select patients with higher risk of relapse in the long term. Furthermore, molecular elements involved in these biological functions could be potentially drug-gable, opening the door to evaluate new compounds against these alterations in the clinical setting. With this approach in mind, we have described genes and gene signatures associated with mitosis that predicted poor outcome specifically in patients with early stage ovarian tumors [6]. However, we envision that an analysis based of functional genomics and protein–protein interactions could provide more robust prediction outcome in ovarian cancers, and a more general overview of the biological characteristics of this disease.

In this project using an *in silico* approach using public transcriptomic data, we identified deregulated functions in early stage ovarian cancer that were associated with worse outcome. Expression of some of these signatures identified patients at a higher risk. A protein–protein interaction analysis revealed hubs of proteins with oncogenic implications that could be inhibited pharmacologically. Of note, a relevant finding was the identification of the histone-lysine N-methyltransferase EZH2, and the ubiquitin-conjugating enzyme E2C as key upregulated interacting proteins. In addition, these proteins were amplified in 10% and 6% of the ovarian tumors. The data presented opens the door to the further assessment of these signatures in clinical studies, and for the evaluation of novel therapies against the mentioned proteins or pathways.

## Material and Methods

### Transcriptomic and gene expression analyses

To identify differences at a transcriptomic level, we used a public dataset (GEO DataSet accession number: GSE14407) of mRNA levels from twelve isolated ovarian epithelial cell lines and twelve isolated serous ovarian cancer epithelial (CEPI) cells. Affymetrix CEL files were downloaded and analyzed with Affymetrix Transcriptome Analysis Console 3.0. Differential gene expression profile for both groups was performed using a minimum fourfold change. OncoPrint™ Platform was used to confirm the GEO DataSet findings (<https://www.oncoPrint.org/resource/login.html>).

### Evaluation of clinical outcome

The publicly available Kaplan–Meier (KM) Plotter Online Tool (<http://kmplot.com/analysis/>) was used to evaluate the relationship between gene expression levels and patient's clinical outcome in early stage ovarian cancer (stage I and II). Only genes significantly associated with detrimental outcome (Hazard Ratio  $\geq 1$  and  $P$ -value  $\leq 0.05$ ) were used for subsequent analysis ( $n = 131$ ). This tool was also used to determine progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in functional combined analyses. All the analyses were performed independently by two authors (SMC and MLR) and reviewed by a third author (EMGM)

(Accession date January 8th 2018). No discrepancies were observed.

### Protein–protein interactions maps and functional evaluation

Using the String Online Tool (<http://www.string-db.org>), we constructed the interactome. The PPI map was based on the list of genes associated with poor PFS. Proteins showing less than two interactions were not considered. Subsequently, we performed a functional screening using Ensembl (<http://www.ensembl.org>), and Gene Ontology (GO) by biological function.

### Selection of potential drug candidates

We used information from Selleckchem ([www.selleckchem.com](http://www.selleckchem.com)) and Genecards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)) to select potentially druggable genes. Then, as described above, we used the STRING tool to build the druggable ovarian cancer interactome. Based on interacting groups, we divided the PPI map in three functional clusters: cell cycle ( $n = 19$ ), DNA damage ( $n = 4$ ), and angiogenesis ( $n = 3$ ). PPI hubs proteins were determined as those

with a higher number of interactions than the average (Edges  $\geq 17.2$ ).

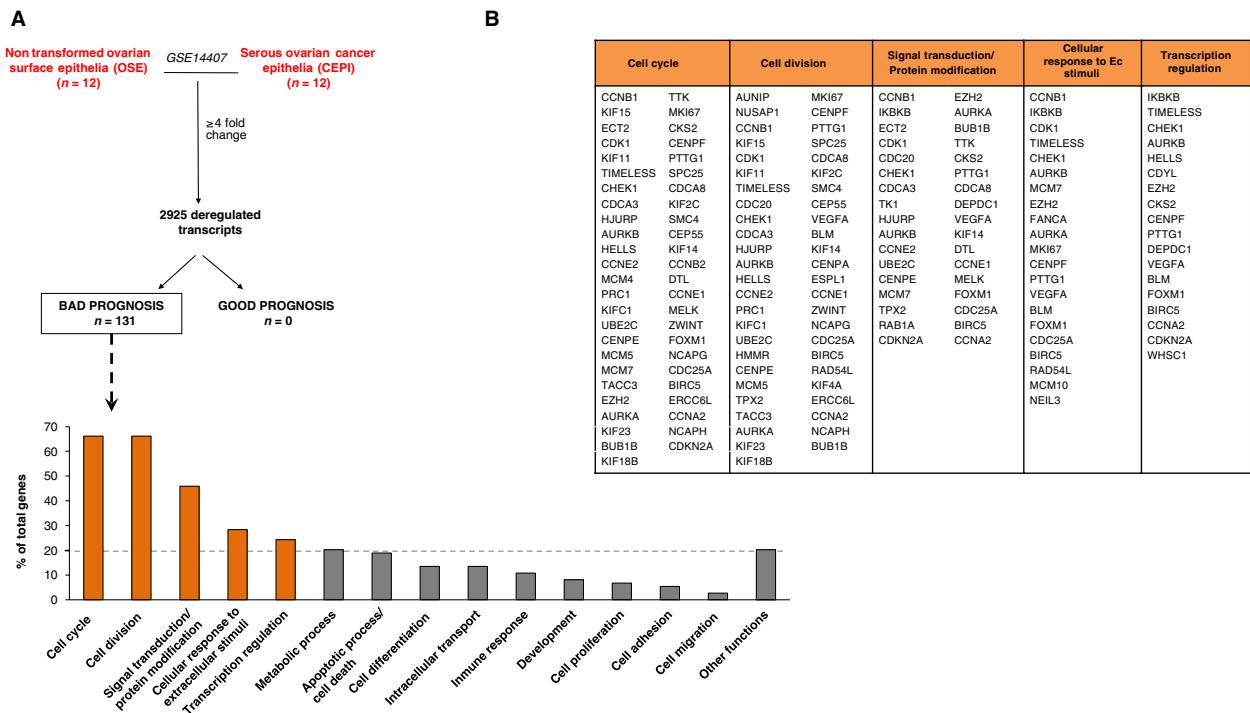
### Identification of molecular alterations

We used data contained at cBioportal ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org); TCGA Ovarian Serous Cystadenocarcinoma,  $n = 603$ ) to identify potential copy number alterations (amplification or deletion), and the presence of mutations in the identified genes.

## Results

### Selection of deregulated genes and functional analyses

To identify deregulated functions in ovarian cancer cells, we used public transcriptomic data (GSE14407), to compare isolated serous ovarian cancer epithelial (CEPI) cells with isolated ovarian epithelial cell lines. Using a minimum fold change of four, we identified 2925 genes of which 131 were associated with poor clinical outcome (Fig. 1A and Table 1). The upregulation of the genes was confirmed using data from human samples contained at Oncomine (Table 1). Protein–protein



**Figure 1.** Transcriptomic analyses comparing isolated serous ovarian cancer epithelial (CEPI) cells with isolated ovarian epithelial cells. (A) Identification of deregulated genes (fold change  $\geq 4$ ) which are associated with bad prognosis in CEPI. (B) Functional enrichment analyses identify cell cycle, cell division, signal transduction/protein modification, cellular response to extracellular stimuli and transcription regulation, as the most altered functions in CEPI.



**Table 1.** List of deregulated genes associated with bad prognosis.

Probe ID	Transcript ID	Gene symbol	AFFYMETRIX		ONCOMINE		KM PLOTTER	
			Fold change	P-Value ANOVA	Fold change	P-Value	PFS	P-Value
211767_at	g13543688	GINS4	4.01	0.002866	2.404	1.11E-05	2.87 (1.54–5.35)	0.0005
228729_at	Hs.23960.0	CCNB1	4.03	8.24E-07	6.152	5.33E-06	2.85 (1.3–6.22)	0.0062
1569241_a_at	Hs2.149839.1	ZNF93	4.06	0.004685	2.296	6.40E-06	2.41 (1.14–5.08)	0.0176
205869_at	g4506144	PRSS1	4.06	0.003394	2.008	2.12E-07	1.91 (1.06–3.45)	0.0296
213100_at	Hs.13350.0	UNC5B	4.07	0.000451	1.351	0.006	1.82 (1.01–3.3)	0.0432
216615_s_at	Hs.2142.1	HTR3A	4.11	0.001305	3.505	4.76E-16	2.23 (1.19–4.15)	0.0098
40020_at	4858618_RC	CELSR3	4.13	9.48E-08	1.502	7.89E-07	3.86 (1.98–7.54)	0
219306_at	g9910265	KIF15	4.17	0.000147	3.696	2.29E-08	2.88 (1.54–5.38)	0.0005
209342_s_at	g4185274	IKBKB	4.17	0.007424	1.31	2.12E-04	2.44 (1.31–4.56)	0.0038
213759_at	Hs.111554.1	ARL4C	4.21	0.008012	3.624	8.81E-06	1.89 (1.06–3.39)	0.0289
206134_at	g7657318	ADAMDEC1	4.21	0.003324	1.87	0.012	1.88 (1.04–3.39)	0.0337
219787_s_at	g8922431	ECT2	4.23	0.000033	10.209	2.81E-08	2.62 (1.42–4.83)	0.0014
210559_s_at	g3126638	CDK1	4.23	0.000803	7.317	4.85E-07	1.8 (1.01–3.23)	0.0447
204444_at	g13699823	KIF11	4.25	0.000272	5.467	7.52E-07	2.73 (1.48–5.03)	0.0008
209053_s_at	Hs.110457.3	WHSC1	4.25	0.000004	3.805	3.67E-10	3.03 (1.57–5.84)	0.0005
209198_s_at	g13279139	SYT11	4.27	0.000005	2.974	1.43E-07	3.4 (1.81–6.39)	0.0001
207156_at	g10800131	HIST1H2AG	4.3	0.006192	1.554	5.81E-06	1.96 (1.1–3.5)	0.0201
205544_s_at	g4503026	CR2	4.34	0.027892	1.428	6.37E-06	3.37 (1.74–6.53)	0.0001
203046_s_at	g4507506	TIMELESS	4.36	4.84E-07	3.434	2.30E-09	1.86 (1.03–3.37)	0.0365
202870_s_at	g4557436	CDC20	4.41	0.000004	11.259	2.44E-06	3.87 (2.01–7.46)	0
202860_at	g7662151	DENND4B	4.43	0.000019	1.563	3.19E-04	3.3 (1.71–6.37)	0.0002
214933_at	Hs.96253.2	CACNA1A	4.45	0.000001	2.563	1.47E-05	2.6 (1.39–4.85)	0.0018
210587_at	g13477368	INHBE	4.47	0.042977	1.32	7.38E-05	2.22 (1.2–4.09)	0.0089
214005_at	Hs.77719.1	GGCX	4.5	2.02E-08	1.837	2.04E-04	2.45 (1.35–4.46)	0.0025
205660_at	g11321576	OASL	4.53	0.006553	2.449	9.95E-05	2.06 (1.13–3.78)	0.0165
219454_at	g13124887	EGFL6	4.54	0.000439	2.582	5.00E-03	2.34 (1.27–4.31)	0.0049
212816_s_at	Hs.84152.2	CBS	4.55	0.000561	2.658	1.00E-03	2.06 (1.14–3.74)	0.0146
205394_at	g4502802	CHEK1	4.6	0.000004	4.147	2.43E-07	2.04 (1.13–3.66)	0.015
221436_s_at	g13876383	CDCA3	4.65	0.001047	4.847	1.30E-09	2.09 (1.15–3.77)	0.0128
207109_at	g7657408	POU2F3	4.66	0.024312	1.741	4.43E-04	2.81 (1.53–5.18)	0.0005
202219_at	g5032096	SLC6A8	4.68	0.000195	1.94	1.76E-07	2.17 (1.18–4)	0.0108
217025_s_at	Hs.89434.1	DBN1	4.69	0.007175	2.141	1.84E-06	2.11 (1.13–3.93)	0.0163
202338_at	g4507518	TK1	4.73	0.00005	4.968	1.55E-08	2.07 (1.13–3.77)	0.0156
222251_s_at	Hs.28906.1	GMEB2	4.81	0.004936	1.339	3.27E-04	5.5 (2.57–11.76)	0
210697_at	g4454677	ZNF257	4.82	0.001284	1.673	1.66E-05	2.06 (1.15–3.7)	0.0135
214339_s_at	Hs.86575.2	MAP4K1	4.87	0.000074	1.866	1.13E-05	2.07 (1.13–3.79)	0.0154
203022_at	g5454009	RNASEH2A	4.94	0.000147	2.785	1.11E-06	2.06 (1.13–3.76)	0.016
206280_at	g4826670	CDH18	4.96	0.006096	1.396	0.004	2.05 (1.14–3.7)	0.0143
211343_s_at	g180828	COL13A1	5	0.000822	1.318	3.17E-04	2.05 (1.13–3.75)	0.0165
206513_at	g4757733	AIM2	5.02	0.007612	1.547	6.09E-04	2.73 (1.46–5.11)	0.0011
204994_at	g11342663	MX2	5.03	0.001647	3.916	3.32E-04	2.2 (1.19–4.06)	0.0098
205163_at	g7019426	MYL6P	5.04	0.000789	1.397	4.94E-06	1.97 (1.1–3.54)	0.0201
218726_at	g8922180	HJURP	5.07	0.010918	5.547	2.20E-09	1.95 (1.08–3.5)	0.023
239219_at	Hs.221197.0	AURKB	5.1	0.001028	2.818	2.34E-05	2.22 (1.04–4.76)	0.0353
202575_at	g6382069	CRABP2	5.27	0.000004	3.216	9.08E-05	2.08 (1.16–3.74)	0.0124
35160_at	4870487_RC	LDB1	5.29	0.00032	1.5	1.00E-03	2.35 (1.27–4.32)	0.0048
212556_at	Hs.239784.0	SCRIB	5.31	5.24E-07	2.578	8.65E-07	2 (1.1–3.65)	0.021
203439_s_at	g12653744	STC2	5.31	0.001003	2.509	1.53E-06	1.85 (1.03–3.35)	0.0379
234040_at	Hs.287543.0	HELLS	5.35	0.004925	2.352	3.86E-05	2.39 (1.11–5.11)	0.0209
221125_s_at	g7657250	KCNMB3	5.47	0.000016	1.637	2.06E-06	2.03 (1.11–3.71)	0.0183
205569_at	g7657660	LAMP3	5.48	0.040774	3.979	3.15E-04	3.56 (1.85–6.85)	0.0001
213520_at	Hs.31442.0	RECQL4	5.48	0.00012	1.358	0.002	2.61 (1.4–4.87)	0.0018
205034_at	g4757931	CCNE2	5.49	0.00002	1.344	2.00E-03	2.29 (1.27–4.11)	0.0046

(Continues)

Table 1. (Continued).

Probe ID	Transcript ID	Gene symbol	AFFYMETRIX		ONCOMINE		KMPLOTTER	
			Fold change	P-Value ANOVA	Fold change	P-Value	HR	P-Value
222037_at	Hs.154443.1	MCM4	5.52	0.013214	4.726	8.00E-08	2.9 (1.55–5.41)	0.0005
218494_s_at	g13236503	SLC2A4RG	5.64	0.000878	2.118	5.86E-06	2.48 (1.33–4.62)	0.0031
212235_at	Hs.301685.0	PLXND1	5.64	0.000117	1.496	4.67E-04	2.05 (1.13–3.71)	0.0152
218296_x_at	g8922469	MSTO1	5.72	0.000026	1.381	0.018	1.83 (1–3.33)	0.0458
218009_s_at	g4506038	PRC1	5.74	9.19E-07	7.214	5.32E-08	2.85 (1.53–5.32)	0.0006
209680_s_at	g12653842	KIFC1	5.78	0.000129	3.845	3.64E-08	2.33 (1.28–4.24)	0.0046
202954_at	g5902145	UBE2C	5.81	2.13E-08	10.184	2.24E-07	3.03 (1.62–5.66)	0.0003
205240_at	g9558734	GPSM2	6.01	0.000545	3.965	2.97E-08	1.81 (1.01–3.25)	0.0435
209262_s_at	g12803666	NR2F6	6.05	2.41E-07	1.61	2.18E-05	2.26 (1.23–4.17)	0.0071
203632_s_at	g7706450	GPRC5B	6.12	0.000022	1.672	0.004	2.22 (1.21–4.04)	0.0078
207165_at	g7108350	HMMR	6.14	0.000011	3.819	1.48E-10	2.35 (1.3–4.25)	0.0037
205046_at	g4502780	CENPE	6.16	0.00057	2.711	1.59E-07	2.55 (1.36–4.75)	0.0024
208394_x_at	g13259505	ESM1	6.2	0.000021	1.496	0.009	2.05 (1.13–3.71)	0.0152
216237_s_at	Hs.77171.1	MCM5	6.22	0.001843	1.795	7.33E-05	2.33 (1.25–4.34)	0.0063
205449_at	g9558738	SAC3D1	6.31	0.000029	1.891	3.53E-05	2.19 (1.2–4)	0.0086
203099_s_at	g4558755	CDYL	6.33	0.000004	1.889	4.26E-05	2.1 (1.15–3.83)	0.013
210983_s_at	g12751125	MCM7	6.48	0.008102	3.523	2.31E-07	2.23 (1.21–4.1)	0.0084
210052_s_at	g6073830	TPX2	6.5	2.90E-08	13.887	1.65E-07	2.55 (1.38–4.69)	0.0019
225846_at	Hs.24743.1	ESRP1	6.53	0.000005	2.135	2.68E-04	2.3 (1.04–5.06)	0.0335
218308_at	g5454101	TACC3	6.54	0.000462	4.047	9.61E-06	4.1 (2.04–8.24)	0
239570_at	Hs.144137.0	RAB1A	6.76	0.000581	1.31	3.07E-04	2.48 (1.1–5.6)	0.0242
203358_s_at	g4758323	EZH2	6.84	0.000002	6.584	1.44E-06	3.63 (1.93–6.8)	0
203806_s_at	g4503654	FANCA	6.87	0.00001	1.793	7.55E-05	2.69 (1.42–5.08)	0.0016
219502_at	g8922721	NEIL3	6.91	0.000004	1.519	1.08E-05	2.36 (1.3–4.28)	0.0035
208079_s_at	g4507278	AURKA	7	3.64E-08	6.504	6.53E-08	2.95 (1.6–5.45)	0.0003
204709_s_at	g13699831	KIF23	7	0.000061	4.68	2.17E-06	2.7 (1.48–4.95)	0.0008
203755_at	g5729749	BUB1B	7.09	6.83E-10	8.04	2.56E-07	2.86 (1.55–5.29)	0.0004
222039_at	Hs.274448.1	KIF18B	7.2	6.26E-09	2.135	4.91E-06	2.4 (1.31–4.37)	0.0032
204822_at	g4507718	TTK	7.21	7.51E-07	15.153	2.06E-09	2.52 (1.38–4.61)	0.0019
212023_s_at	Hs.80976.1	MKI67	7.25	1.04E-07	4.023	5.17E-10	1.94 (1.07–3.51)	0.0256
204170_s_at	g4502858	CKS2	7.39	6.82E-08	5.956	3.85E-05	2.06 (1.14–3.73)	0.0147
207183_at	g5453665	GPR19	7.43	0.000063	2.901	8.95E-09	3.07 (1.64–5.72)	0.0002
207828_s_at	g4885132	CENPF	7.52	0.000002	3.811	1.75E-06	2.64 (1.43–4.87)	0.0013
206157_at	g4506332	PTX3	7.56	0.000006	2.79	0.004	2.93 (1.6–5.37)	0.0003
218039_at	g7705950	NUSAP1	7.63	5.89E-09	9.731	7.45E-07	2.08 (1.16–3.75)	0.0123
203554_x_at	g11038651	PTTG1	7.68	0.000002	5.99	1.80E-05	3.34 (1.76–6.34)	0.0001
209891_at	g9963834	SPC25	7.73	0.000027	2.928	9.73E-24	2.45 (1.34–4.47)	0.0026
221520_s_at	g12804484	CDCA8	7.78	0.000076	3.705	5.44E-07	2.63 (1.41–4.91)	0.0016
218755_at	g5032012	KIF20A	7.9	1.87E-08	9.021	9.21E-08	2.56 (1.37–4.78)	0.0021
201761_at	g13699869	MTHFD2	7.92	0.000004	3.82	1.20E-04	2.68 (1.45–4.94)	0.001
204649_at	g4885624	TROAP	7.95	0.000014	3.096	5.11E-08	2.83 (1.49–5.35)	0.0008
209408_at	g1695881	KIF2C	8.01	2.31E-08	2.834	6.75E-11	2.43 (1.33–4.44)	0.003
201663_s_at	g4885112	SMC4	8.12	0.008518	7.44	9.32E-09	2.55 (1.38–4.71)	0.0019
218542_at	g8922501	CEP55	8.28	0.000158	8.075	1.50E-08	1.89 (1.05–3.4)	0.0304
222958_s_at	Hs.133260.0	DEPDC1	8.47	0.000182	3.833	2.12E-07	2.61 (1.19–5.7)	0.0127
222008_at	Hs.154850.0	COL9A1	8.48	0.000545	1.946	2.30E-16	1.93 (1.08–3.47)	0.0249
210512_s_at	g3719220	VEGFA	8.51	6.97E-09	2.741	1.17E-07	3.37 (1.75–6.48)	0.0001
205733_at	g4557364	BLM	8.53	0.000002	2.88	3.59E-06	1.99 (1.1–3.59)	0.0205
236641_at	Hs.116649.0	KIF14	8.88	0.000311	3.139	5.27E-06	2.28 (1.01–5.13)	0.0414
204962_s_at	g4585861	CENPA	8.9	0.000014	11.775	2.63E-09	2.48 (1.35–4.57)	0.0026
202705_at	g10938017	CCNB2	9.15	1.13E-07	10.154	1.59E-06	1.87 (1.04–3.37)	0.0329
218585_s_at	g7705575	DTL	9.2	2.49E-10	6.089	1.58E-07	1.89 (1.06–3.38)	0.0289
38158_at	4852842_RC	ESPL1	9.2	8.96E-09	4.341	6.11E-07	3.19 (1.69–6.04)	0.0002

(Continues)

**Table 1.** (Continued).

Probe ID	Transcript ID	Gene symbol	AFFYMETRIX		ONCOMINE		KM PLOTTER	
			Fold change	<i>P</i> -Value ANOVA	Fold change	<i>P</i> -Value	PFS	<i>P</i> -Value
213523_at	Hs.9700.0	CCNE1	9.36	2.03E-07	7.062	8.28E-09	1.84 (1.02–3.33)	0.0407
222946_s_at	g12652906	AUNIP	9.41	0.00175	2.956	7.47E-08	2.11 (0.99–4.52)	0.0485
213075_at	Hs.94795.0	OLFML2A	9.44	0.000481	1.423	3.00E-03	1.86 (1.04–3.34)	0.0348
204825_at	g7661973	MELK	9.59	0.000007	10.6	2.98E-07	1.95 (1.08–3.5)	0.0233
212563_at	Hs.30736.0	BOP1	9.61	0.000165	1.669	3.35E-06	2.03 (1.11–3.69)	0.0186
204026_s_at	g6857828	ZWINT	9.92	1.65E-09	7.001	1.71E-05	2.05 (1.14–3.7)	0.015
202580_x_at	g11386144	FOX M1	10.06	0.000022	5.982	8.64E-09	3.03 (1.6–5.73)	0.0003
205694_at	g4507756	TYRP1	10.15	0.000772	1.624	2.09E-34	1.79 (1–3.23)	0.0486
204584_at	Hs.1757.0	L1CAM	10.27	0.000008	3.985	7.02E-15	3.02 (1.63–5.58)	0.0002
218662_s_at	g11641252	NCAPG	10.35	4.18E-08	3.207	2.13E-10	3.28 (1.76–6.14)	0.0001
204695_at	Hs.1634.0	CDC25A	10.39	0.000002	2.633	2.49E-05	2.39 (1.31–4.34)	0.0033
212807_s_at	Hs.281706.1	SORT1	10.54	4.63E-07	1.977	9.60E-06	2.05 (1.12–3.75)	0.0172
202094_at	Hs.1578.0	BIRC5	10.82	0.000018	4.83	2.20E-10	2.85 (1.53–5.31)	0.0006
204558_at	g4506396	RAD54L	11.24	0.000856	2.09	6.38E-06	2.85 (1.53–5.32)	0.0006
218355_at	g7305204	KIF4A	11.53	5.42E-08	2.359	1.00E-03	2.82 (1.51–5.27)	0.0007
219650_at	g8923111	ERCC6L	12.29	6.30E-07	2.245	8.13E-06	2.24 (1.24–4.04)	0.0063
204437_s_at	g9257206	FOLR1	12.72	0.000017	1.696	2.00E-03	2.05 (1.13–3.7)	0.0155
203418_at	g4502612	CCNA2	13.14	0.00196	4.795	2.28E-07	1.82 (1.02–3.26)	0.0403
205242_at	g5453576	CXCL13	16.29	0.0001	2.091	2.94E-08	1.83 (1.02–3.28)	0.0411
205572_at	g4557314	ANGPT2	19.81	0.000006	1.312	0.029	2.02 (1.12–3.63)	0.0164
212949_at	Hs.1192.0	NCAPH	19.94	7.17E-07	2.497	1.51E-06	3.06 (1.62–5.78)	0.0003
206772_at	g4826953	PTH2R	21.94	0.000027	5.579	8.58E-10	3.14 (1.66–5.97)	0.0002
222962_s_at	g11527601	MCM10	29.44	6.72E-09	2.718	1.28E-07	2.33 (1.06–5.1)	0.0296
207039_at	g4502748	CDKN2A	45.1	0.000022	6.481	5.60E-14	2.01 (1.11–3.63)	0.0186
206373_at	g4507970	ZIC1	99.77	2.13E-08	3.712	8.24E-07	2.19 (1.22–3.93)	0.0073

interaction network showed 130 nodes and a cluster coefficient of 0.62 (Fig. S1).

### Functional gene signatures associated with poor outcome

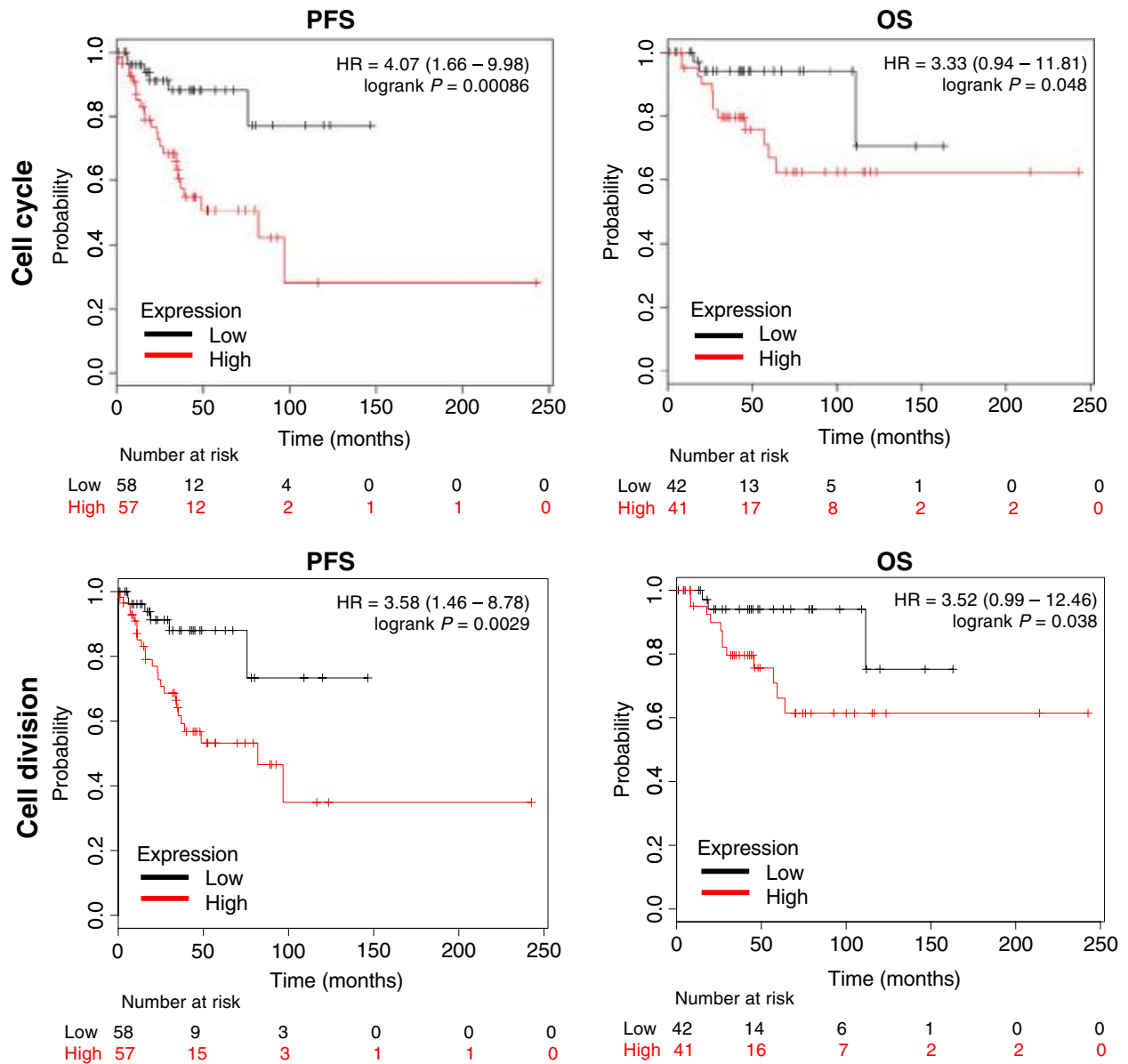
Functional annotation of the identified genes demonstrated several altered functions (Fig. 1A and B). By selecting those more represented (with a more than 20% of total genes expression), we identified cell cycle, cell division, signal transduction/protein modification, cellular response to extracellular (EC) stimuli, and transcription regulation. Table S1 provides detailed information of all functions and genes included within each function.

Using the KM Plotter online tool, we explored the association with clinical outcome of genes within each function. We did so to observe the role of each group with clinical prognosis. Genes within the cell cycle and cell division were associated with detrimental PFS and OS (PFS: HR = 4.07 (95% CI 1.66–9.98),  $P = 0.00086$  and OS: HR = 3.33 (95% CI 0.94–11.81),  $P = 0.048$  for cell cycle and PFS: HR = 3.58 (95% CI 1.46–8.78),  $P = 0.0029$  and OS HR = 3.52 (95% CI 0.99–12.46),

$P = 0.038$ , for cell division) (Fig. 2). Results in the same range were observed for signal transduction/protein modification (PFS HR = 3.73 (95% CI 1.52–9.14),  $P = 0.002$  and OS HR = 3.33 (95% CI 0.94–11.81),  $P = 0.048$ ) and for transcription regulation PFS data (PFS: HR = 3.69 (95% CI 1.51–9.03),  $P = 0.0022$ ). Interestingly, a poorer outcome for OS was found for this latter group (OS: HR = 12.55 (95% CI 1.65–95.48),  $P = 0.0017$ ) (Fig. 3). Finally, the group of genes within the cellular response to EC stimuli function showed the worse outcome for both PFS and OS (PFS: HR = 6.37 (95% CI 2.22–18.28),  $P = 7.7e-05$  and OS: HR = 13.25 (95% CI 1.74–100.79), (Fig. 3).

### Druggable opportunities within the identified functions

The description of functional signatures has the advantage of identifying relevant molecular alterations that have a potential oncogenic role in this disease, and therefore are susceptible to be inhibited. To get insights into potential therapies for those patients harboring these signatures, we used the drug gene interaction database

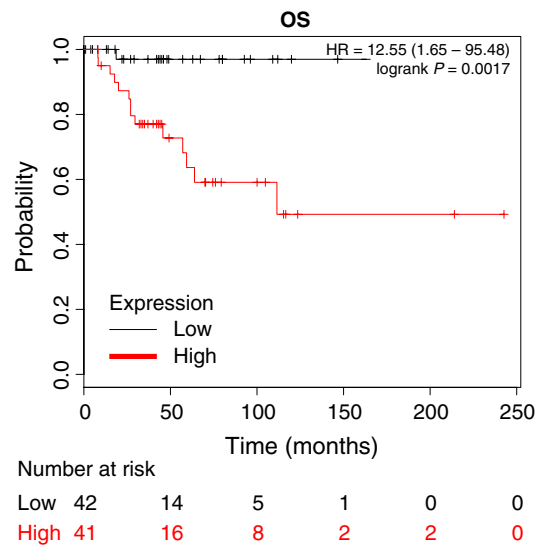
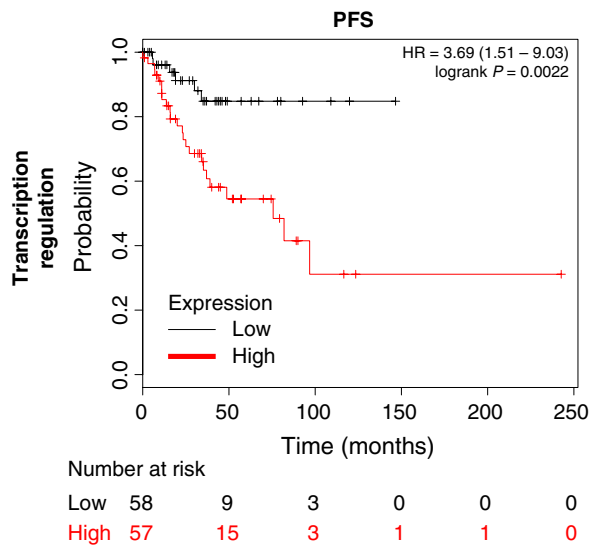
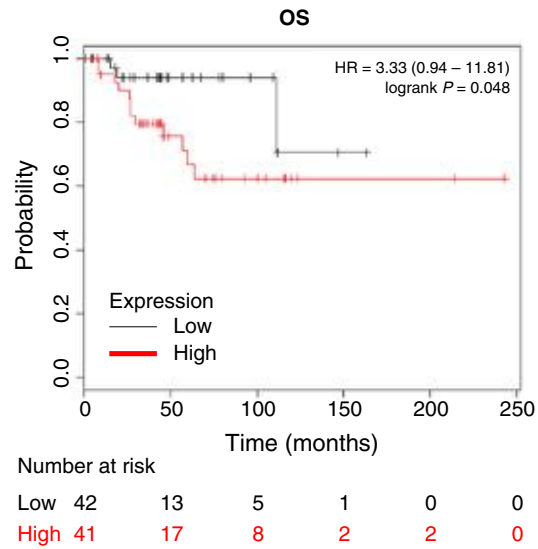
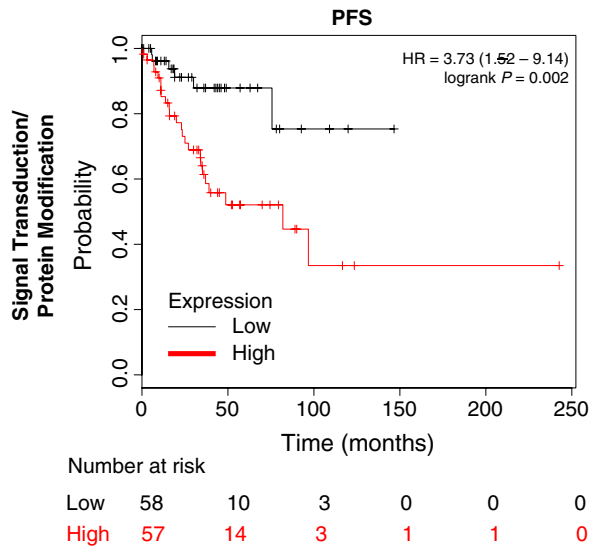
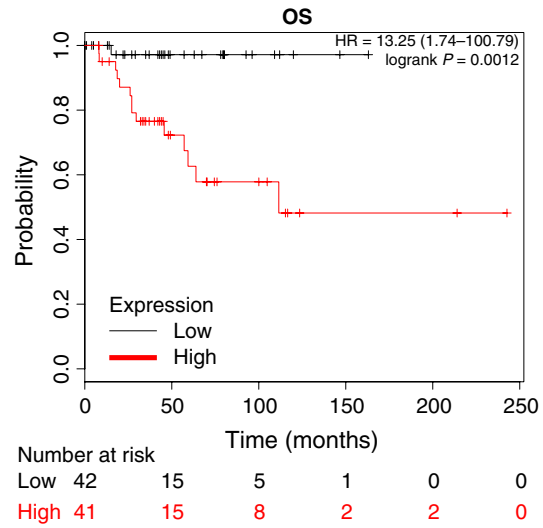
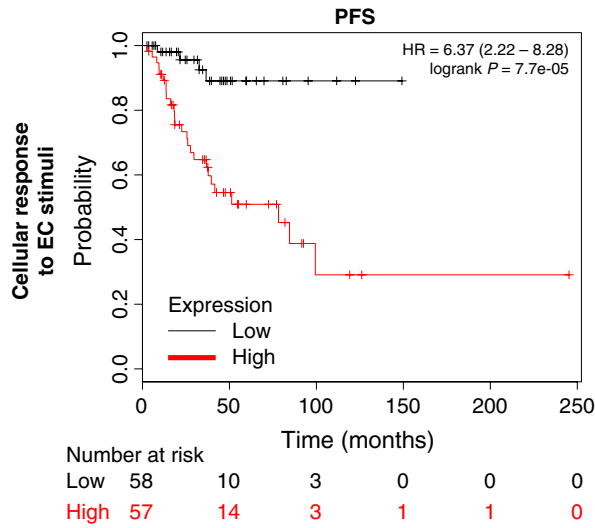


**Figure 2.** Association with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in stage I and II ovarian cancer of gene sets included in the cell cycle and cell division function.

available in Genecards and confirmed by other sources as described in Material and Methods. We therefore selected 26 genes that could potentially be inhibited pharmacologically (Table S2). We next used the proteins coded by these genes to build a protein–protein interaction network. We found 223 interactions (edges) linking 26 proteins (nodes). As expected, the clustering coefficient in this druggable network was high (0.85), confirming

that most of the proteins act as a functional unit. We identified three different functional clusters with special affinity: Cell cycle ( $n = 19$  genes), DNA damage ( $n = 4$  genes), and angiogenesis ( $n = 3$  genes) (Fig. 4A). Of note, DNA damage was included as part of the cellular response to EC stimuli in our initial functional annotation, and angiogenesis was one of the functions identified in the functional annotation studies, although was less

**Figure 3.** Association with progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in stage I and II ovarian cancer of gene sets included in the cellular response to extracellular (EC) stimuli, signal transduction/protein modification and transcription regulation function.



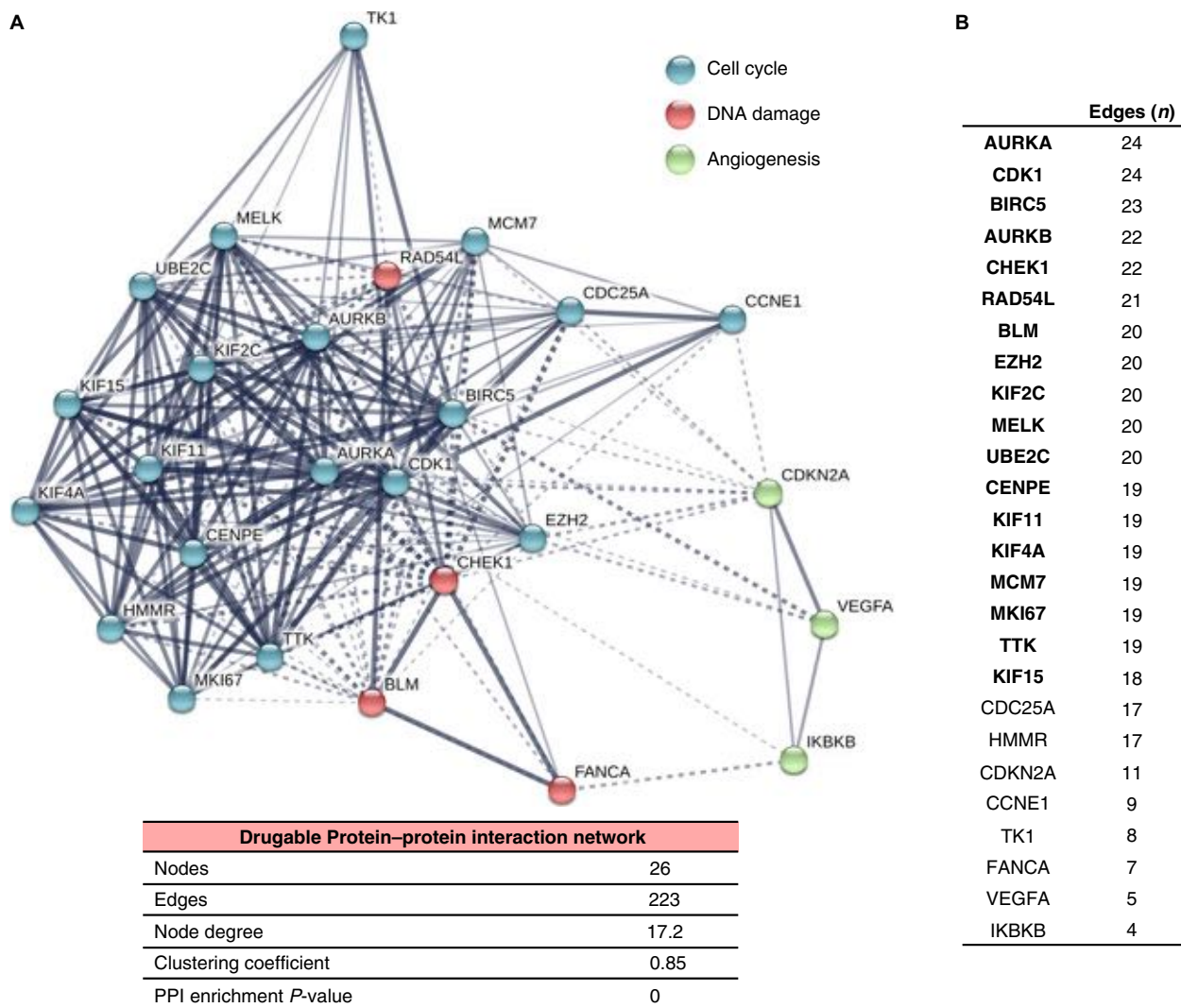
represented (Table S1). These results suggest an important role of this in the druggable PPI. Next, based on the number of interactions, we selected the hub proteins of the interactome, defined as those with a higher number of interactions than the average (Edges  $\geq 17.2$ ;  $n = 18$ ) (Fig. 4B).

Some of the genes identified here have been described previously in ovarian cancer as deregulated, including *AURKA*, *AURKB*, *CDK1*, *BIRC5*, and *CHEK1* among others [6]. Of note, the histone-lysine N-methyltransferase *EZH2* is a novel epigenetic target not previously described, and the ubiquitin-conjugating enzyme *E2C* (*UBE2C*), which belongs to the ubiquitin

ligase family of enzymes is also a potentially druggable protein with limited evaluation in ovarian cancer. Interestingly, these two genes strongly associate with worse prognosis for OS (Table S3)

### Molecular alterations in the identified signatures

To complete our study, we used the cancer genomics database (cBioportal [7]) to obtain information about copy number alterations or mutations of the identified druggable genes. Most of genes that code for the identified druggable hubs were found to be amplified in ovarian cancer (Table 2).



**Figure 4.** Protein-protein interaction (PPI) map of the 26 potential druggable targets. (A) Potentially druggable targets were used to construct a PPI network using the online tool STRING. Blue nodes represent proteins involved in cell cycle. Red and green nodes represent proteins associated with DNA damage and angiogenesis, respectively. The nodes indicate proteins coded by the identified druggable targets and edges indicate the number of interactions. The number of average interactions per node is represented by the node degree. The clustering coefficient indicates the average node density of the map. (B) List of hub proteins according to the number of interactions (edges) in the druggable PPI network.



**Table 2.** Molecular alterations of the identified hub proteins.

311 Ovarian serous cystadenocarcinoma samples			
Gene Name	Amplification	Deletion	Mutation
<b>EZH2</b>	10.30%	0.30%	–
RAD54L	9.00%	–	0.60%
AURKA	8.70%	–	–
KIF2C	6.40%	–	0.30%
BIRC5	6.10%	0.60%	–
<b>UBE2C</b>	5.80%	–	–
BLM	5.50%	0.30%	1.30%
CHEK1	3.90%	0.60%	–
MKI67	3.50%	1.00%	1.30%
MCM7	3.20%	–	–
KIF4A	1.90%	0.30%	0.60%
CDK1	1.90%	–	0.60%
TTK	1.60%	0.30%	0.60%
MELK	1.30%	–	0.60%
KIF15	1.00%	0.30%	0.30%
CENPE	0.60%	1.30%	0.60%
AURKB	0.60%	0.60%	–
KIF11	0.60%	0.30%	–

Of note, the new potential targets *EZH2* and *UBE2C* were amplified in around 10% and 6% of ovarian cancers, respectively. Deletions and mutations were present at a very low frequency. Amplifications of other genes such as *RAD54L*, *AURKA*, *KIF2C*, or *BIRC5* were also observed.

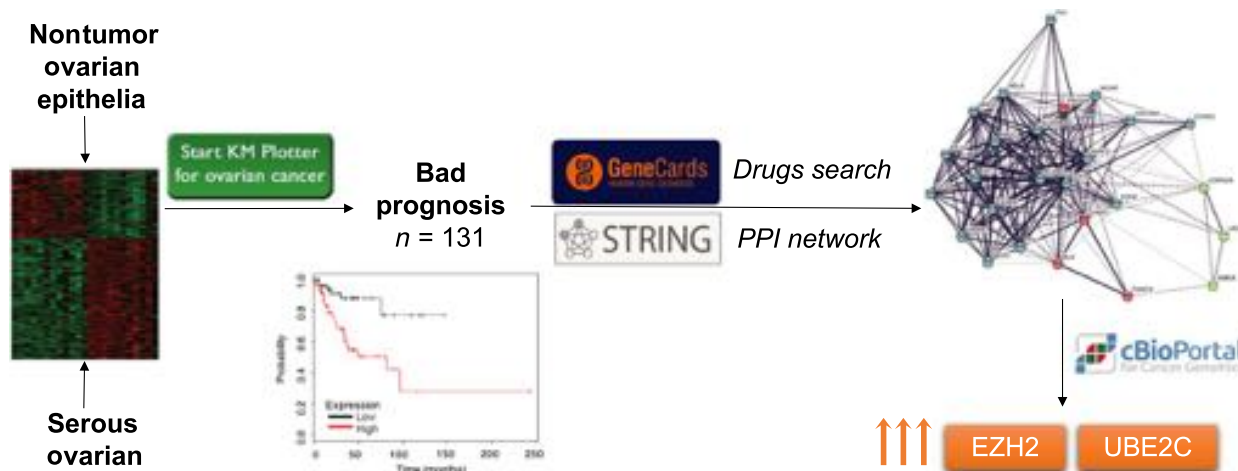
## Discussion

In the present article, we describe functional gene signatures and PPI networks associated with adverse outcome in early stage ovarian cancer. These signatures and interacting protein networks provide information about druggable opportunities that could be validated preclinically.

As ovarian cancer is an incurable disease, the identification of oncogenic functions and protein interacting networks associated with detrimental outcome is expected to improve the therapeutic landscape of this disease. In early stage ovarian cancer, the identification of patients with worse outcome is even more relevant as it may help in the selection of patients for additional adjuvant therapy, and even guide the evaluation of novel therapies.

In our study, we have identified five functions linked with detrimental PFS and OS in early stage ovarian cancer. Within cell cycle and cell division, we found genes such as *AURKA*, *AURKB*, *CDK1*, *BIRC5*, and *CHEK1* that are associated with control of mitosis and cell cycle regulation [8]. Of note, some of these genes have been reported previously to be linked with detrimental outcome [6]. Inhibitors against proteins coded by these genes, such as *AURKA* and *B* or *CHEK1*, are currently in clinical development, so our findings provide support for the specific development of those agents in ovarian cancer.

An interesting finding was the identification of protein modifications and transcription regulation as upregulated functions. Protein modification and degradation is a vulnerability of tumor cells as has been demonstrated by the clinical activity of proteasome inhibitors in some hematological malignancies [9, 10]. Ubiquitination is a necessary pathway to target proteins for degradation [11]. The ubiquitin-conjugating enzyme E2C is required for the destruction of mitotic cyclins and for cell cycle progression [12]. *UBE2C* has been found to be overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma playing a role in cancer progression [13, 14], as well as, in other tumor types such as nonsmall cell lung cancer [15]. However, there are no published data regarding the role of this protein in ovarian cancer. As this family of proteins can be inhibited pharmacologically [11], the study of such agents in ovarian cancer is warranted.

**Figure 5.** Study graphical abstract.

Other relevant findings include the identification of EZH2 as upregulated and involved in the PPI network. EZH2 has been associated with epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancers [16]. Of note, EZH2 inhibitors seem to be particularly active in malignant rhabdoid tumors, which are deficient in the Switch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeling complexes INI1 (SMARCB1). Of interest, a subgroup of ovarian tumors has a similar phenotype and has shown responses to inhibitors of this complex [17]. In our study, we observe that EZH2 is a relevant component of the PPI network therefore confirming a potentially druggable vulnerability. Of note, drugs such as tazemetostat, a potent and selective EZH2 inhibitor is currently in phase II testing [18]. Other molecular alteration includes *RAD54L* that is amplified in 9% of patients. The protein associated by this gene is involved in the homologous recombination repair of DNA double-strand breaks [19]. Finally, genes such as *KIF2C* or *AURKA* are involved in mitotic formation and chromosome segregation [20].

Our analysis highlights several druggable functions in early stage ovarian cancer for which new agents are currently in preclinical or clinical evaluation. However, we should acknowledge that our study has some limitations. This is an *in silico* analysis that need confirmatory studies using human samples. In addition, functional assessment has the limitation for the redundancy of functions, as many genes can be classified in many different annotations. Finally, there are limitations for the existed software that help identifying druggable opportunities mainly for redundancy.

In conclusion, we have identified biological functions and PPI networks that are prognostic in early stage ovarian cancer and may guide future drug development (Fig. 5). Some of the identified genes such as *EZH2* or *UBE2C* have not been described previously in ovarian cancer but are amplified, linked with detrimental prognosis and potentially druggable, and warrant preclinical and clinical assessment.

## Acknowledgments

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (PI16/01121), Diputación de Albacete and CRIS Cancer Foundation (to AO) and the framework agreement between University of Castilla-La Mancha and Albacete Provincial Council (UCLM-Excma. Diputación de Albacete) in support to research activity (to EMGM). We would like to also thanks to the cancer associations AMUMA and ACEPAIN for supporting part of this work. EMGM is funded by the implementation research program of the UCLM (UCLM resolution date: 31/07/2014), with a contract for accessing the Spanish System of Science,

Technology and Innovation-Secti (cofunded by the European Commission/FSE funds).

## Conflict of Interest

None declared.

## References

1. Wilson, M. K., E. Pujade-Lauraine, D. Aoki, M. R. Mirza, D. Lorusso, A. M. Oza, A. Bois, I. Vergote, A. Reuss, M. Bacon, and M. Friedlander. 2017. Fifth Ovarian cancer consensus conference of the gynecologic cancer intergroup: recurrent disease. *Ann. Oncol.* 28:727–732.
2. Karam, A., J. A. Ledermann, J. W. Kim, J. Sehouli, K. Lu, C. Gourley, N. Katsumata, R. A. Burger, B. H. Nam, M. Bacon, and C. Ng. 2017. Fifth Ovarian cancer consensus conference of the gynecologic cancer intergroup: first-line interventions. *Ann. Oncol.* 28:711–717.
3. George, A., S. Kaye, and S. Banerjee. 2017. Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14:284–296.
4. Jayson, G. C., R. Kerbel, L. M. Ellis, and A. L. Harris. 2016. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 388:518–529.
5. Ocana, A., and A. Pandiella. 2017. Targeting oncogenic vulnerabilities in triple negative breast cancer: biological bases and ongoing clinical studies. *Oncotarget* 8:22218–22234.
6. Ocaña, A., J. Pérez-Peña, A. Alcaraz-Sanabria, V. Sánchez-Corrales, C. Nieto-Jiménez, A. J. Templeton, B. Seruga, A. Pandiella, and E. Amir. 2016. In silico analyses identify gene-sets, associated with clinical outcome in ovarian cancer: role of mitotic kinases. *Oncotarget* 7:22865–22872.
7. Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, and Y. Antipin. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2:401–404.
8. Dominguez-Brauer, C., K. L. Thu, J. M. Mason, H. Blaser, M. R. Bray, and T. W. Mak. 2015. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol. Cell* 60:524–536.
9. San-Miguel, J. F., V. T. Hungria, S. S. Yoon, M. Beksac, M. A. Dimopoulos, A. Elghandour, W. W. Jedrzejczak, A. Günther, T. N. Nakorn, N. Siritanaratkul, and P. Corradini. 2014. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed



- or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15:1195–1206.
10. San Miguel, J. F., R. Schlag, N. K. Khuageva, M. A. Dimopoulos, O. Shpilberg, M. Kropff, I. Spicka, M. T. Petrucci, A. Palumbo, O. S. Samoilova, and A. Dmoszynska. 2008. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 359:906–917.
  11. Gallo, L. H., J. Ko, and D. J. Donoghue. 2017. The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis. *Cell Cycle* 16:634–648.
  12. Bajaj, S., S. K. Alam, K. S. Roy, A. Datta, S. Nath, and S. Roychoudhury. 2016. E2 Ubiquitin-conjugating Enzyme, UBE2C Gene, Is Reciprocally Regulated by Wild-type and Gain-of-Function Mutant p53. *J. Biol. Chem.* 291:14231–14247.
  13. Palumbo, A. Jr, N. M. Da Costa, M. De Martino, R. Sepe, S. Pellicchia, V. P. L. de Sousa, P. N. Neto, C. D. Krueel, A. Bergman, L. E. Nasciutti, and A. Fusco. 2016. UBE2C is overexpressed in ESCC tissues and its abrogation attenuates the malignant phenotype of ESCC cell lines. *Oncotarget* 7:65876–65887.
  14. Lin, J., D. A. Raoof, Z. Wang, M. Y. Lin, D. G. Thomas, J. K. Greenon, T. J. Giordano, M. B. Orringer, A. C. Chang, D. G. Beer, and L. Lin. 2006. Expression and effect of inhibition of the ubiquitin-conjugating enzyme E2C on esophageal adenocarcinoma. *Neoplasia* 8:1062–1071.
  15. Zhang, Z., P. Liu, J. Wang, T. Gong, F. Zhang, J. Ma, and N. Han. 2015. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C regulates apoptosis-dependent tumor progression of non-small cell lung cancer via ERK pathway. *Med. Oncol.* 32:149.
  16. Cardenas, H., J. Zhao, E. Vieth, K. P. Nephew, and D. Matei. 2016. EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7:84453–84467.
  17. Chan-Penebre, E., K. Armstrong, A. Drew, A. R. Grassian, I. Feldman, S. K. Knutson, K. Kuplast-Barr, M. Roche, J. Campbell, P. Ho, and R. A. Copeland. 2017. Selective killing of SMARCA2- and SMARCA4-deficient small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type cells by inhibition of EZH2: in vitro and in vivo preclinical models. *Mol. Cancer Ther.* 16:850–860.
  18. Christofides, A., T. Karantanos, K. Bardhan, and V. A. Boussiotis. 2016. Epigenetic regulation of cancer biology and anti-tumor immunity by EZH2. *Oncotarget* 7:85624–85640.
  19. Mazina, O. M., M. J. Rossi, N. H. Thoma, and A. V. Mazin. 2007. Interactions of human rad54 protein with branched DNA molecules. *J. Biol. Chem.* 282:21068–21080.
  20. Ritter, A., M. Sanhaji, A. Friemel, S. Roth, U. Rolle, F. Louwen, and J. Yuan. 2015. Functional analysis of phosphorylation of the mitotic centromere-associated kinesin by Aurora B kinase in human tumor cells. *Cell Cycle* 14:3755–3767.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Functional classification of the deregulated genes.

**Table S2.** List of potentially druggable genes.

**Table S3.** Association with progression free survival (PFS) and overall survival (OS) of the identified hub proteins.

**Figure S1.** Protein-protein interaction network of the 130 deregulated genes associated with detrimental prognosis.