



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de los mecanismos de resistencia a tamoxifeno y palbociclib en cáncer de mama

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Jimena Rodriguez

Directora de tesis: Dra. Virginia Novaro

Consejera de estudios: Dra. Marta Tesone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Proteínas Quinasas y Cáncer - Instituto de
Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2021

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A TAMOXIFENO Y PALBOCICLIB EN CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con la incidencia y mortalidad más alta en mujeres en el mundo. Aproximadamente el 70% de los tumores de mama expresan receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PR) y son por eso susceptibles al tratamiento con inhibidores hormonales como el tamoxifeno. Si bien la terapia hormonal es eficaz para el tratamiento de estos tumores, un alto porcentaje de los pacientes eventualmente recaen a esta terapia. Recientemente se ha aprobado el uso de inhibidores de ciclo celular, como el palbociclib, para el tratamiento de los pacientes que recaen a la terapia endócrina o que presentan cáncer de mama metastásico. Sin embargo, de igual forma que con el tratamiento hormonal, estos pacientes eventualmente dejan de responder al tratamiento o incluso algunos no responden desde el comienzo.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia asociados al tratamiento con tamoxifeno y con palbociclib, para poder proponer mejores estrategias terapéuticas para los pacientes que recaen a los mismos, así como también para evitar o retrasar el desarrollo de resistencia. Para esto, utilizamos las líneas de cáncer de mama humano T47D y MCF-7 para generar variantes resistentes a ambas drogas por presión selectiva con dichos agentes por 12 a 24 meses. Generamos primero las variantes resistentes a tamoxifeno (T47D-TR y MCF-7-TR) y a palbociclib (T47D-PR y MCF-7-PR), y luego a partir de las resistentes a tamoxifeno generamos las variantes doble resistentes a tamoxifeno y palbociclib (T47D-TPR y MCF-7-TPR), simulando la secuencia terapéutica utilizada en la clínica.

Evaluamos la morfología de las líneas resistentes creciendo en 2D y observamos que presentan mayor atipia celular que las líneas parentales, forman estructuras irregulares y desorganizadas creciendo en 3D sobre Geltrex y en suspensión como mamóferas, lo cual se correlaciona con una expresión aberrante o reducida de E-cadherina. Además, encontramos que la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presenta un aumento en la capacidad de formar mamóferas, así como en la expresión de marcadores de *stemness*. A su vez, tanto la variante resistente a tamoxifeno MCF-7-TR como la resistente a palbociclib MCF-7-PR presentan una mayor capacidad migratoria que la línea *wild type*. Por otra parte, las variantes resistentes presentan una menor tasa de proliferación que la línea parental, tanto *in vitro* como *in vivo*. En contraposición a esto, encontramos aumento en la expresión de proteínas del ciclo celular como ciclina D1, ciclina E2, CDK4, CDK6 y CDK1 y disminución en Rb, dependiendo de la variante analizada. Encontramos también una menor expresión de ER y PR en las variantes resistentes, así como también un aumento en la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de AKT o de la proteína ribosomal S6, y un aumento en PKC α .

Evaluamos la sensibilidad *in vitro* de las variantes a inhibidores de PI3K/AKT/mTOR que actúan a distintos niveles de la vía, y encontramos un mayor efecto inhibitorio utilizando rapamicina (inhibidor de mTOR) que utilizando alpelisib (inhibidor de PI3K α). Además, observamos que la combinación de rapamicina con palbociclib es más efectiva que los tratamientos, tanto *in vitro* como *in vivo*, no solo en reducir la proliferación y el crecimiento tumoral, sino también inhibiendo la expresión de proteínas del ciclo celular y la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

Finalmente, para validar los resultados obtenidos en las líneas celulares, utilizamos xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX) obtenidos a partir de biopsias de pacientes con tumores de mama ER+, sensibles y resistentes a tamoxifeno y palbociclib. Disgregamos los PDXs para obtener células individuales, las cuales fueron crecidas *ex-vivo* en 3D sobre Matrigel. Observamos que la mayoría de los cultivos son sensibles al tratamiento con alpelisib (inhibidor de PI3K α). Por otra parte, la totalidad de los PDXs analizados son sensibles al tratamiento con everolimus (inhibidor de mTOR), independientemente de la presencia de mutaciones o alteraciones en genes de la vía de PI3K/AKT/mTOR. Además, la triple combinación de palbociclib con everolimus y fulvestrant (inhibidor de ER) es más efectiva que las drogas individuales, no solo inhibiendo proteínas del ciclo celular sino también la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

En conjunto, nuestros resultados indican que el tratamiento combinado de palbociclib con inhibidores de mTOR es efectivo tanto en un contexto de resistencia a tamoxifeno como a palbociclib, inhibiendo en paralelo tanto la proliferación celular y el crecimiento tumoral como la activación del eje ciclina D1/CDK4/6/Rb y de la vía de PI3K/AKT/mTOR. Esta combinación podría evitar una reactivación de esta vía *downstream* mTOR y así retrasar el desarrollo de resistencia.

En conclusión, en este trabajo generamos y caracterizamos modelos experimentales de resistencia adquirida a tamoxifeno y a palbociclib, simulando la secuencia terapéutica utilizada en la clínica. Estos modelos son útiles para estudiar tanto en cultivo celular como *in vivo* los mecanismos asociados al desarrollo de resistencia, para de esta manera poder proponer mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de los tumores de mama que recaen a estos esquemas, así como también contribuir a la identificación de posibles biomarcadores de respuesta terapéutica.

Palabras clave: Cáncer de mama, Resistencia, Tamoxifeno, Palbociclib, PI3K/AKT/mTOR

STUDY OF THE MECHANISMS OF RESISTANCE TO TAMOXIFEN AND PALBOCICLIB IN BREAST CANCER

Breast cancer is the malignant neoplasm with the highest incidence and mortality in women worldwide. Approximately 70% of breast tumors express estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and are therefore sensitive to endocrine inhibitors, such as tamoxifen. Although endocrine therapy is effective for the treatment of these tumors, a significant amount of patients eventually relapse. Recently, the use of cell cycle inhibitors such as palbociclib has been approved for the treatment of patients that relapse to hormone therapy or have metastatic breast cancer. However, patients ultimately relapse to this treatment, or do not respond from the beginning.

The aim of this work was to study the mechanisms of resistance associated with tamoxifen and palbociclib treatment, in order to propose better therapeutic strategies for patients to avoid or delay cancer relapse. To accomplish this, we exposed T47D and MCF-7 breast cancer cell lines to progressively increasing concentrations of tamoxifen or palbociclib over a period of 12 to 24 months, thus generating resistant variants. Firstly, we obtained the tamoxifen-resistant variants (T47D-TR and MCF-7-TR) and palbociclib-resistant variants (T47D-PR and MCF-7-PR). We next used the tamoxifen-resistant variants to generate the double resistant variants (T47D-TPR and MCF-7-TPR), as a means to mimic the treatment sequence used in the clinic.

We evaluated the morphology of the resistant variants growing in 2D and found that they display increased cellular atypia compared to their parental lines. They also form irregular and disorganized structures growing in 3D on Geltrex and in suspension as mammospheres, which correlates with an aberrant or reduced E-cadherin expression. Furthermore, the tamoxifen-resistant variant T47D-TR shows increased mammosphere forming capacity, in concordance with higher expression of stemness markers. Moreover, both the tamoxifen-resistant variant MCF-7-TR and the palbociclib-resistant variant MCF-7-PR display enhanced migratory capacity. Regarding cell proliferation, the resistant cell lines show decreased growth rate compared to the parental cell line, both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, we found cell cycle proteins such as cyclin D1, cyclin E2, CDK4, CDK6 and CDK1 to be increased in the resistant variants in contrast with their reduced proliferation rates, as well as reduced Rb. Additionally, the resistant variants exhibit lower expression of ER and PR, overactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway at the level of AKT or ribosomal protein S6, and higher expression of PKC α than the *wild type*.

We next evaluated the response of these cell lines to different PI3K/AKT/mTOR inhibitors that act at different levels of the pathway. We found that rapamycin (mTOR inhibitor) was more effective in suppressing cell proliferation than alpelisib (PI3K inhibitor). Furthermore, rapamycin and palbociclib combination had a greater effect than each drug

used separately in suppressing cell proliferation and tumor growth as well as in reducing cell cycle proteins and PI3K/AKT/mTOR activation.

Finally, in order to validate these results, we used patient derived xenografts (PDX) obtained from ER+ breast cancer patients that harbored sensitive or resistant tumors to tamoxifen and palbociclib. We disaggregated the PDXs to obtain single cells which were next grown on Matrigel. We found that most cultures are sensitive to alpelisib (PI3K inhibitor), whereas the totality of PDXs are sensitive to everolimus (mTOR inhibitor), regardless of the presence of mutations or alterations in PI3K/AKT/mTOR pathway. The triple combination of palbociclib with everolimus and fulvestrant (ER inhibitor) is also more effective than each drug separately in reducing cell cycle proteins and PI3K/AKT/mTOR activation.

Collectively, our results indicate that combined treatment of palbociclib with mTOR inhibitors is effective in the context of resistance to either tamoxifen or palbociclib by inhibiting cell proliferation and tumor growth as wells as regulating the activation of the cyclin D1/CDK4/6/Rb axis and PI3K/AKT/mTOR pathway. The proposed combination could therefore prevent pathway reactivation downstream mTOR, delaying the development of resistance.

In conclusion, in this work we were able to generate and characterize experimental models of acquired resistance to tamoxifen and palbociclib, following the therapeutic sequence used in the clinic. These models are useful to study the mechanisms associated with resistance both in cell culture and *in vivo*, in order to suggest better therapeutic strategies for patients that relapse to these therapies, as well as contribute to the identification of new biomarkers of therapeutic response.

Key words: Breast cancer, Resistance, Tamoxifen, Palbociclib, PI3K/AKT/mTOR

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
• La glándula mamaria y los receptores hormonales.....	9
• El cáncer de mama	11
• Terapia hormonal en cáncer de mama	11
• Vía de PI3K/AKT/mTOR.....	13
• Inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en cáncer de mama.....	15
• Ciclo celular	19
• Inhibidores de ciclo celular para el tratamiento de tumores resistentes endócrinos.....	19
• Interacciones entre el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb y la vía de PI3K/AKT/mTOR	21
• Mecanismos de resistencia a inhibidores hormonales y de CDK4/6.....	23
• <i>Stemness</i> y resistencia a terapias.....	26
• Modelos experimentales	27
• Racional para el proyecto que desarrollamos	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
ENSAYOS EN CULTIVO CELULAR	31
• GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A TAMOXIFENO Y PALBOCICLIB.....	31
• ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN / CONTEO CELULAR.....	32
• EXTRACTOS PROTEICOS Y WESTERN BLOT.....	32
• ENSAYO DE CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	33
• INMUNOFLUORESCENCIA.....	34
• ENSAYO DE CRECIMIENTO EN SUSPENSIÓN (MAMOSFERAS)	35
• ENSAYO DE DILUCIÓN LÍMITE PARA CUANTIFICACIÓN DE MAMOSFERAS (ELDA).....	35
• ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR EN <i>TRANSWELL</i>	36
• EXTRACTOS DE RNA Y RT-qPCR	36
• SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO.....	38

ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	39
• ANIMALES.....	39
• OBTENCIÓN DE TUMORES A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES ...	39
• TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES ENDÓCRINOS, PALBOCICLIB Y RAPAMICINA.....	40
• INMUNOHISTOQUÍMICA	40
ENSAYOS A PARTIR DE PDXs.....	41
• OBTENCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES A PARTIR DE PDXs.....	41
• ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A DROGAS	41
• EXTRACTOS PROTEICOS	42
ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES	45
PRIMERA PARTE: CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LAS VARIANTES RESISTENTES.	45
1) Evaluación de la morfología celular.	45
2) Evaluación de la capacidad de formación de mamosferas y la expresión de marcadores de <i>stemness</i>	48
3) Evaluación de la proliferación y el crecimiento tumoral.	51
4) Análisis de la capacidad migratoria e invasiva.	55
5) Evaluación de la expresión de receptores hormonales y proteínas del ciclo celular	58
6) Evaluación de la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.....	63
7) Análisis de nuevas mutaciones adquiridas mediante secuenciación de exoma completo.....	65
8) Estado de activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y expresión de ER al retirar las drogas de selección.....	66
SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LAS VARIANTES RESISTENTES A INHIBIDORES DE PI3K/AKT/mTOR Y DE CDK4/6.	68
9) Comparación de la sensibilidad a inhibidores que actúan a distintos niveles de la vía PI3K/AKT/mTOR.....	68
10) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib.	71
11) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular.	74
12) Efecto del tratamiento con inhibidores de CDK4/6 sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR a distintos tiempos.....	79
RESUMEN DE RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES.....	84

RESULTADOS EN XENOTRASPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDX)	86
TERCERA PARTE: CARACTERIZACIÓN DE PDXs PROVENIENTES DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ER+.....	86
13) Evaluación <i>ex-vivo</i> de la sensibilidad de los PDXs a tamoxifeno y palbociclib.	89
14) Activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y expresión de proteínas del ciclo celular.....	90
15) Evaluación <i>ex-vivo</i> de la sensibilidad de los PDXs a alpelisib y everolimus.	91
16) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib.	93
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	98
• Utilidad de modelos experimentales preclínicos.....	98
• Características morfológicas de las variantes resistentes.	99
• Proliferación <i>in vitro</i> y crecimiento <i>in vivo</i> de las variantes resistentes.....	100
• Análisis de la presencia de células madre tumorales en las variantes resistentes. ...	102
• Capacidad migratoria e invasiva de las variantes resistentes.	104
• Alteraciones en la expresión de proteínas del ciclo celular en las variantes resistentes.	105
• Alteraciones en la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.	106
• Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y tratamientos combinados.	107
• Relevancia de la utilización de PDXs.	111
• Conclusiones finales.....	112
APÉNDICE	114
BIBLIOGRAFÍA	116

ABREVIATURAS

BSA: Seroalbúmina bovina

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ER: Receptor de estrógenos

ERE: Elementos respondedores a estrógenos

HER-2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HRE: Elementos respondedores a hormonas

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IP: Ioduro de propidio

IRS-1: Sustrato 1 del receptor de insulina

LTED: Deprivación prolongada de estrógenos

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NSG: Ratones NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null

PDX: Xenotrasplante derivado de paciente

PIP2: Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PR: Receptor de progesterona

RTK: Receptor de membrana con actividad de tirosina-quinasa

SERD: Regulador negativo selectivo del receptor de estrógenos

SERM: Modulador selectivo del receptor de estrógenos

SFB: Suero fetal bovino

INTRODUCCIÓN

▪ La glándula mamaria y los receptores hormonales

La glándula mamaria es un tejido hormono-dependiente, que comienza a desarrollarse durante la embriogénesis, y continúa su desarrollo y diferenciación durante la preñez y la lactancia, en respuesta a las hormonas sexuales estrógenos y progesterona, secretadas por los ovarios.

En la glándula mamaria normal, el rol de los estrógenos a través de su receptor (ER) se asocia con la proliferación epitelial durante el ciclo menstrual y la ramificación de los conductos mamaros durante la preñez (Nilsson et al. 2001). La progesterona por su parte, a través de la unión a su receptor (PR) promueve el desarrollo glandular de la mama en la pubertad y favorece la diferenciación alveolar durante la preñez (Obr et al. 2012). Tradicionalmente los progestágenos han sido considerados hormonas diferenciadoras del epitelio mamario (Foidart et al. 1998).

El ER y el PR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se incluyen dentro de la subfamilia de receptores esteroides, a la que también pertenecen entre otros, los receptores de andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Los receptores esteroides son factores de transcripción que existen como apoproteínas inactivas formando parte de complejos multiproteicos que se encuentran en el citoplasma y/o en el núcleo. En el modelo clásico, al unirse al ligando (hormona) se activan a través de una transformación que involucra fosforilación, cambio de conformación y liberación de proteínas del shock térmico (hsp 70 y hsp 90). Los receptores activados se dimerizan y se unen al ADN en secuencias consenso llamadas elementos respondedores a hormonas (HRE). Una vez unido a estas regiones del ADN, el dímero de receptor facilita la formación del complejo de preiniciación reclutando factores co-activadores y/o represores, para activar o reprimir la transcripción de ciertos genes blanco (Tsai et al. 1994). Toda esta familia de receptores son fosfoproteínas y su función es regulada por fosforilación. La fosforilación juega un rol fundamental en la translocación del receptor al núcleo, en la unión al ADN y en la interacción con otras proteínas.

Existe también un mecanismo no clásico de acción de los receptores hormonales que consiste en una activación ligando-independiente. En ausencia de hormona exógena, estos pueden ser activados por la unión de factores de crecimiento. Cuando un factor de crecimiento se une a su receptor específico, se enciende una cascada de señalización de quinasas que terminan por fosforilar al receptor, activándolo y permitiendo su interacción con otros factores de transcripción y coactivadores para unirse finalmente a los promotores de los genes blanco (Lange 2004). Entre las vías responsables de la activación ligando-independiente de los receptores hormonales podemos mencionar fundamentalmente a la de PI3K/AKT/mTOR y la de MAPK/ERK, como profundizaremos más adelante.

Existen dos isoformas diferentes del ER, normalmente referidas como α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2), situados en el cromosoma 6 (6q25.1) y en el cromosoma 14 (14q), respectivamente. Ambos tipos de receptores, α y β , se expresan en una amplia variedad de tejidos, aunque existen notables diferencias en sus patrones de expresión (Couse et al. 1997). El receptor ER α es expresado mayoritariamente en endometrio, glándula mamaria, células del estroma ovárico e hipotálamo. Con respecto al ER β podemos decir que en algunos tejidos esta isoforma se opone a las acciones de ER α e inhibe la proliferación celular, siendo supresor tumoral en próstata y ovario. En la glándula mamaria ER β no tiene un efecto trófico tan relevante como el ER α (Warner et al. 2010, Mal et al. 2020).

Por otro lado, el gen de PR se ubica en el cromosoma 11 (q22-q23) y da origen a dos isoformas, la isoforma B (PRB) y la isoforma A (PRA), generadas a partir de dos inicios de la traducción diferentes (Rousseau-Merck et al. 1987). Los niveles de expresión de PR están regulados principalmente por los estrógenos en tejidos como mama, útero, endometrio, glándula pituitaria y cerebro (Graham et al. 1997). El promotor proximal que regula la transcripción de PR contiene elementos respondedores a estrógenos (ERE) que son reconocidos por ER el cual se une e interactúa con otros factores de transcripción. La expresión de PR también puede ser estrógeno independiente, por ejemplo, puede ser regulada a través del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que ejercen su efecto a través de vías de señalización como la de PI3K/AKT/mTOR (Cui et al. 2003).

A pesar de estar expuestos continuamente a sus respectivas hormonas tróficas, los tejidos normales poseen un crecimiento limitado. La proliferación celular descontrolada durante los procesos tumorales puede deberse a la hiperactividad de señales que estimulan el crecimiento, o bien a una falla en señales que lo inhiben (Palmieri et al. 2002). Un porcentaje significativo de los tumores epiteliales que se originan en tejidos hormono-dependientes, como por ejemplo la mama, expresan los receptores hormonales característicos del tejido y dependen para su crecimiento de la presencia de las hormonas tróficas específicas (Ali et al. 2000). Existen evidencias clínicas que muestran la relación de los estrógenos con diversos factores epidemiológicos de riesgo asociados al cáncer de mama (Kelsey et al. 1993). Asimismo, se demostró que ciertos análogos de la progesterona como el acetato de medroxiprogesterona son carcinogénicos o que aumentan la incidencia de tumores mamarios espontáneos en ratones (Nagasawa et al. 1988, Lanari et al. 2009). El PR es además un importante marcador de respuesta en cáncer de mama. La presencia de PR en tumores ER positivos indica probabilidad de respuesta al tratamiento endócrino (Horwitz et al. 1978, Horwitz et al. 1985), mientras que su ausencia se asocia a una sensibilidad reducida a agentes hormonales (McGuire et al. 1991).

El tejido mamario es un tejido altamente dinámico y diferenciado donde cada componente está especializado en una función particular en un estadio determinado. La estructura del órgano y el microambiente tisular que lo rodea juegan un papel esencial durante

el desarrollo, la diferenciación y la involución de la glándula (Nelson et al. 2006). La interacción entre las células epiteliales y la matriz extracelular también es crítica para la función normal de la misma. Alteraciones tanto en la interacción entre los componentes del tejido, la arquitectura tisular, como en la homeostasis endócrina, pueden provocar inflamación, hiperplasia mamaria y la aparición de tumores.

- **El cáncer de mama**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres en todo el mundo, constituyendo el 25% de todos los cánceres en mujeres, con más de 2 millones de casos nuevos diagnosticados por año y siendo el responsable de ocasionar 627.000 muertes anuales (The Lancet 2018).

En Argentina, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos. La tasa de incidencia es de 73 casos por cada 100.000 mujeres, con una mortalidad de 17,9 por cada 100.000 mujeres. Esto representa un volumen de más de 21.500 casos nuevos y cerca de 6.000 muertes por año, según datos del Instituto Nacional del Cáncer (<https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>).

Biológica y clínicamente, el cáncer de mama es una enfermedad sumamente heterogénea. Con el objetivo de estandarizar el diagnóstico, y constituir una herramienta para el tratamiento y seguimiento de la patología, se han diseñado sistemas de clasificación que permiten catalogar los diversos tumores mamarios. Los mismos se clasifican de acuerdo con su histología, con la presencia de marcadores moleculares, y con el patrón de expresión génica. Rutinariamente el cáncer de mama se clasifica en base a la presencia o ausencia de tres receptores presentes en las células mamarias, el receptor de estrógenos (ER), de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) (Carlson et al. 2009). Entre un 60 y 80% de los tumores mamarios diagnosticados expresan receptores hormonales de ER y PR (ER+/PR+) (DeSantis et al. 2019, Szostakowska et al. 2019), por lo que la terapia endócrina dirigida a bloquear la señalización a través del ER o a inhibir la síntesis de estradiol es la principal estrategia para el tratamiento de dichos tumores. Por otro lado, entre el 20 y 30% de los tumores presentan sobreexpresión del receptor HER-2 (Buzdar 2009, Ross et al. 2009, Szostakowska et al. 2019), lo que los hace susceptibles al tratamiento con anticuerpos bloqueantes de HER-2 como el trastuzumab. Finalmente, entre el 10 y 15% de los tumores restantes no expresan ER, PR ni HER-2 y por esto se clasifican como triple negativos (Anders et al. 2009, Szostakowska et al. 2019), para los cuales se utiliza principalmente quimioterapia.

- **Terapia hormonal en cáncer de mama**

El crecimiento y desarrollo de los tumores de mama que expresan receptores hormonales se encuentra estimulado principalmente por los estrógenos (Johnston et al.

2003). Por lo tanto, la terapia endócrina dirigida a bloquear la función estrogénica constituye el tratamiento por excelencia para los pacientes con tumores que expresan receptores hormonales. Esta puede administrarse pre-quirúrgicamente (como tratamiento neoadyuvante), post-quirúrgicamente (adyuvante) y en el estadio avanzado o metastásico (como tratamiento paliativo). El tratamiento a seguir depende del estadio de la enfermedad y de la expresión de receptores hormonales y HER-2. Se ha demostrado que la terapia adyuvante puede reducir el riesgo de recurrencia entre un 30-50% (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005).

Existen distintos compuestos utilizados para el tratamiento endócrino. Los SERMs son moduladores selectivos del ER, pudiendo mostrar actividad agonista y antagonista dependiente del tejido en el cual se encuentren, sin inducir la degradación del receptor. El más utilizado es el tamoxifeno (Jordan 2014). En las células tumorales mamarias, el tamoxifeno actúa principalmente como un antagonista, pero la adquisición de actividad agonista sería responsable de una proporción de los casos de resistencia al tratamiento. Además de los SERMs, se utilizan reguladores negativos selectivos del ER (SERDs) como el fulvestrant (Dauvois et al. 1993), los cuales llevan a la degradación del ER. Por último, se utilizan también inhibidores de la enzima aromatasa (como el anastrozole y el letrozole) los cuales bloquean la síntesis endógena de 17- β -estradiol (Palmieri et al. 2014).

El tamoxifeno ha funcionado hasta la actualidad como el principal tratamiento para pacientes premenopáusicas con tumores ER+. Se ha demostrado que un régimen de tratamiento con tamoxifeno durante 10 años se asocia a una reducción en la mortalidad por cáncer de mama y a una mejora en la supervivencia. En las mujeres postmenopáusicas, sin embargo, este tratamiento prolongado con tamoxifeno produjo un incremento en el riesgo y en la mortalidad por cáncer de endometrio (Davies et al. 2013). En general, para pacientes postmenopáusicas se utilizan los inhibidores de aromatasa o el fulvestrant, este último principalmente en segunda línea en pacientes con cáncer de mama avanzado que recaen a terapias hormonales previas como tamoxifeno o inhibidores de aromatasa (Johnston et al. 2010, Croxtall et al. 2011).

A pesar de que la terapia endocrina ha sido una herramienta exitosa en el tratamiento del cáncer de mama ER+, una proporción de los tumores no responden a la terapia desde un inicio (resistencia *de novo* o constitutiva) o desarrollan con el tiempo resistencia al tratamiento (**resistencia adquirida**) (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005, Cuzick et al. 2010). Entre el 10 y 50% de los pacientes con cáncer de mama eventualmente recaen a la terapia, dependiendo del estadio y otras características del tumor al iniciar el tratamiento. Adicionalmente, estos tumores tienen una tendencia a permanecer en latencia, a menudo por muchos años y las metástasis pueden aparecer hasta 20 años después del diagnóstico inicial (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005, Ignatiadis et al. 2013, Zhang et al. 2013, Pan et al. 2017).

Existen varios mecanismos posibles que contribuyen a la adquisición de resistencia y que podrían llevar a una activación hormono-independiente del ER. Uno de estos

mecanismos es la sobreexpresión o amplificación de HER-2 (Arpino et al. 2004, Ellis et al. 2006, Ross et al. 2009, Puglisi et al. 2012). Por otra parte, evidencia clínica y experimental ha asociado a la hiperactivación de la vía PI3K/AKT/mTOR con el fenómeno de resistencia endócrina (Miller et al. 2010, Fox et al. 2012).

- **Vía de PI3K/AKT/mTOR**

La vía PI3K/AKT/mTOR es una vía de señalización intracelular ampliamente estudiada ya que regula numerosos procesos celulares, tales como proliferación, crecimiento celular, traducción de proteínas, supervivencia, apoptosis y regulación del metabolismo celular, entre otros (Hennessy et al. 2005). Desregulaciones en esta vía se encuentran asociadas con numerosas enfermedades tales como el cáncer, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Hers et al. 2011).

La familia de proteínas quinasas de lípidos fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) está dividida en tres clases: I, II y III. Las PI3Ks de clase I son las más frecuentemente alteradas en cáncer humano, y a su vez se subdividen en IA e IB. Son moléculas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica (p110 α , β , δ o γ) y una reguladora (p85 para la clase IA y p101 para la clase IB) (Jean et al. 2014).

Las PI3Ks IA son activadas predominantemente por receptores de membrana con actividad de tirosina-quinasa (RTKs) en respuesta a factores de crecimiento (como IGF-1 y EGF, entre otros) y a través de otras proteínas intracelulares como PKC, SHP1, Rac, Rho y Src (Jiang et al. 2008). Una vez que el receptor se encuentra activado, interactúa directamente con la subunidad p85, liberando a la subunidad p110 de su efecto inhibitorio. Como consecuencia de esto, la PI3K se activa y se localiza en la membrana plasmática. Una vez activada, PI3K cataliza la síntesis de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2). PIP3 se une a proteínas que contienen dominio de homología a pleckstrina, entre las que se encuentra la proteína quinasa B o AKT. Esta unión recluta AKT en la membrana, donde es fosforilada en Thr308 por una quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1), y en Ser473 por una PDK2. Se conocen varias proteínas con actividad de PDK2, aunque el principal complejo con esta actividad es el complejo *mammalian target of rapamycin* mTOR/Rictor (mTORC2) (Liu et al. 2009). Una vez activada, AKT (que presenta tres isoformas: AKT 1, 2 y 3) fosforila proteínas blanco involucradas en la regulación de numerosas funciones celulares. En su forma activa, AKT fosforila TSC2, inactivando el complejo TSC1-TSC2, lo cual conduce a la activación del complejo mTOR/Raptor (mTORC1). Este complejo fosforila a diversas proteínas, regulando la síntesis proteica y el crecimiento celular (Dowling et al. 2010). Una de las proteínas fosforiladas por mTORC1 es la quinasa S6K, encargada de fosforilar a su vez a la proteína ribosomal S6 en alguno de sus múltiples residuos serina, como la Ser240/244 y la Ser235/236 (Meyuhas 2008). La proteína ribosomal S6 puede además ser fosforilada en Ser235/236 directamente a través de RSK, quinasa que forma parte en la vía de RAS/ERK (Roux et al.

2007, Salmond et al. 2009), así como también a través de las quinasas PKA y CK1 (Meyuhas 2015).

El sistema se regula principalmente a través de PTEN, una fosfatasa considerada supresor tumoral que actúa desfosforilando al PIP3 y formando PIP2. Otro mecanismo de control es la retroalimentación negativa que ejerce S6K sobre ciertos activadores de PI3K como el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) (Metz et al. 2011, Oleksiewicz et al. 2011). La activación de la quinasa S6K por mTORC1 lleva, en ciertas condiciones, a la fosforilación del IRS-1 en residuos serina, promoviendo su degradación y por lo tanto la inactivación de PI3K (Shah et al. 2006) (Figura 1).

Nuestro laboratorio se aboca al estudio del rol de esta vía en el desarrollo de resistencia terapéutica y en la progresión del cáncer de mama. En particular, en un trabajo previo hemos resaltado la participación de la activación de la **proteína ribosomal S6** en el proceso de reacción estromal durante la regresión tumoral luego del tratamiento con agentes endócrinos (Polo et al. 2015). En otros trabajos de nuestro laboratorio encontramos un papel diferencial de las isoformas de AKT1 y AKT2 en la progresión, con AKT1, a través de la regulación de S6, favoreciendo la proliferación celular aún en ausencia de estradiol, y AKT2 favoreciendo la migración e invasión celular a través de la regulación de F-actina y vimentina (Riggio et al. 2017). Es por ello que actualmente estamos analizando la presencia de estas proteínas en muestras de tumores de pacientes que recaen a la terapia hormonal (tesis doctoral de la Lic. Cecilia Perrone, FCEN-UBA).

A lo largo de este trabajo evaluaremos la fosforilación de AKT y de S6 como marcadores de activación de esta vía. En particular, si bien S6 no es la única proteína que se activa *downstream* mTOR, decidimos analizar esta fosforilación ya que, a diferencia de los anticuerpos para mTOR, existen buenos anticuerpos para evaluar pS6 tanto a nivel de western blot, como de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en tejidos. No descartamos evaluar otros marcadores de activación *downstream* mTOR en el futuro.

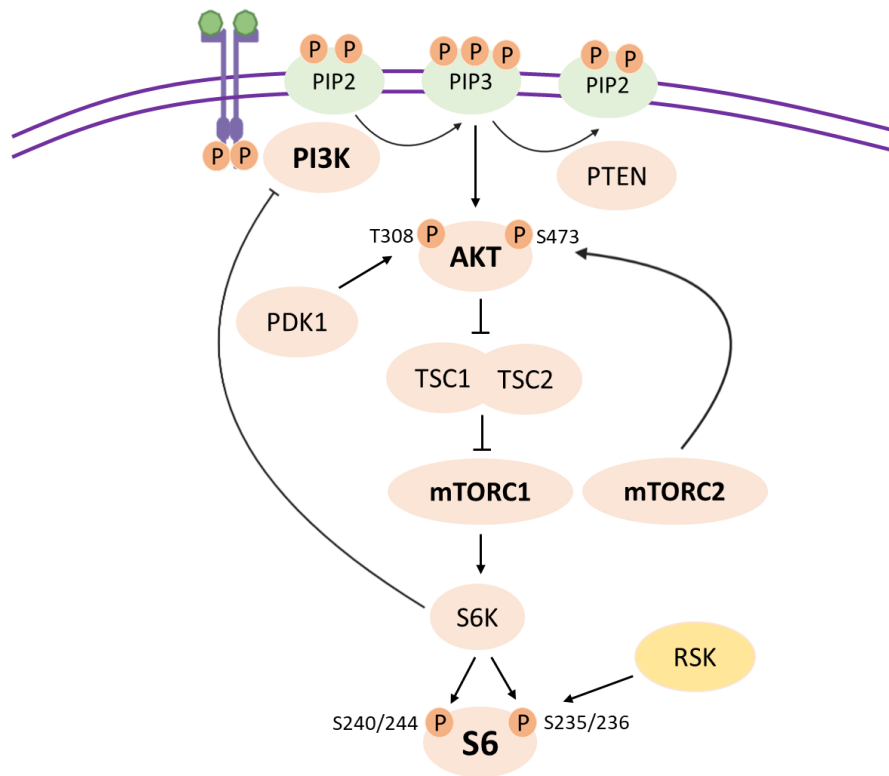


Figura 1. Efectores relevantes de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

- **Inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en cáncer de mama**

La vía de PI3K/AKT/mTOR es la vía más comúnmente hiperactivada en la mayoría de los tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, próstata, gástrico y pulmonar (Kreiserberg et al. 2004, Cheng et al. 2005, Jiang et al. 2020). Numerosas evidencias demuestran que esta hiperactivación en tumores malignos influencia la tumorigénesis, proliferación, crecimiento, apoptosis, invasión, metástasis, fenotipo *stem*, transición epitelio-mesenquimal, microambiente inmune y resistencia a drogas de las células tumorales (Jiang et al. 2020).

Se estima que alrededor del 70% de los tumores de mama presentan alguna alteración en componentes de esta vía (Lopez-Knowles et al. 2010). Estas alteraciones son frecuentemente mutaciones en PI3K, AKT o pérdida de PTEN (Liu et al. 2009, Dienstmann et al. 2014, Janku et al. 2018). La mayoría de estas mutaciones se encuentran en el gen *PIK3CA*, que codifica para la subunidad catalítica de PI3K p110 α (Jiang et al. 2020). Como resultado de dichas mutaciones la actividad enzimática de PI3K se ve incrementada (Zhao et al. 2008). Dos de las mutaciones activantes más comunes encontradas en el gen *PIK3CA* en líneas celulares de cáncer de mama son H1047R y E545K (Zhao et al. 2005, Bader et al. 2006).

Asimismo, numerosos trabajos han asociado la sobreactivación de la vía PI3K/AKT/mTOR con el desarrollo de resistencia endocrina en cáncer de mama (Tokunaga et al. 2006, Ciruelos Gil 2014). Esta asociación se debe, en parte, a la activación

ligando-independiente del ER a través de PI3K y AKT. Se ha postulado en los últimos años que el diseño de terapias endócrinas combinadas con inhibidores específicos de la vía PI3K/AKT/mTOR podría evitar o retrasar la resistencia en tumores que expresan receptores hormonales (Ciruelos et al. 2013, Lauring et al. 2013, Piccart et al. 2014).

En la actualidad existen distintos inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR diseñados para inhibir los diferentes intermediarios de esta vía (Figura 2). En general, podemos mencionar tres grandes grupos, los inhibidores de PI3K, los de AKT, y los de mTOR, aunque también existen inhibidores duales PI3K/mTOR e inhibidores de otras proteínas involucradas en esta vía como PDK1 (Lee et al. 2015).

Los inhibidores a nivel de PI3K pueden ser específicos para alguna de las isoformas de la subunidad catalítica p110 (como el alpelisib, que inhibe específicamente la isoforma α) o inhibir varias isoformas simultáneamente (BKM-120, wortmannin y LY294002, entre otros). Dentro de los inhibidores de AKT, podemos diferenciar los que inhiben específicamente las isoformas AKT1 (A-674563) o AKT2 (CCT128930), y los que inhiben todas en simultáneo, como el MK-2202. Con respecto a los inhibidores a nivel de mTOR, la rapamicina fue el primero en ser desarrollado. Este compuesto es un inhibidor alostérico específico de mTORC1 (Chiarini et al. 2015). Sin embargo, exposiciones prolongadas o altas concentraciones de rapamicina podrían resultar inhibitorias del complejo mTORC2, probablemente al secuestrar moléculas recién sintetizadas de mTOR (Sarbasov et al. 2006, Efeyan et al. 2010). Posteriormente fueron desarrollados otros análogos de la rapamicina llamados "rapalogs", como el temsirolimus (CCI-779) y el everolimus (RAD001) (Chiarini et al. 2015). Por último, existen también inhibidores duales de los complejos mTORC1/mTORC2, como el AZD2014, inhibidores duales PI3K/mTOR, como el BEZ235 o inhibidores de PDK1 como el GSK2334470.

Estos inhibidores han demostrado efectividad en distintos modelos experimentales de cáncer de mama ER+, tanto *in vitro* como *in vivo* (Guichard et al. 2015, Ribas et al. 2015, Chen et al. 2017, Woo et al. 2017, Chen et al. 2018). Estos hallazgos llevaron a evaluar el efecto de la administración de inhibidores de esta vía en combinación con agentes endocrinos en la clínica. En 2012, a partir de los resultados del estudio BOLERO-2, la terapia combinada de everolimus (inhibidor de mTORC1) con exemestano (inhibidor de aromatasas) fue incorporada a las guías del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para pacientes con cáncer de mama ER+ metastásico refractario a inhibidores de aromatasas (Baselga et al. 2012, Yardley et al. 2013). Un estudio posterior, sostiene que incluso dicha terapia podría resultar beneficiosa como tratamiento adyuvante sistémico de primera línea para evitar o retrasar la resistencia endócrina (Beck et al. 2014). En el año 2019, a partir de los resultados del estudio SOLAR-1, el inhibidor específico de PI3K α alpelisib fue aprobado por la FDA para su utilización en pacientes con cáncer de mama ER+ avanzado, que recaen al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y presenten mutaciones en el gen *PIK3CA*, en combinación con terapia hormonal (Andre et al. 2019).

En la actualidad existen distintos ensayos clínicos donde se evalúa la utilización de inhibidores de PI3K, AKT y mTOR en combinación con terapia hormonal para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama ER+ avanzado o metastásico que recaen a una primera o segunda línea de tratamiento. Algunos ejemplos son los ensayos donde se evalúan inhibidores de PI3K (NCT01633060, NCT02404844, NCT02506556, NCT03056755), inhibidores de AKT (NCT01277757, NCT01776008) e inhibidores de mTOR (NCT02216786, NCT01805271). Estos inhibidores también se encuentran en evaluación en ensayos clínicos para el tratamiento de otros tipos de cáncer además del cáncer de mama (Figura 3).

Si bien actualmente se está empezando a considerar la presencia de mutaciones en el gen *PIK3CA* como criterio para determinar la administración de inhibidores de esta vía, como es en el caso de alpelisib, todavía surgen interrogantes sobre el valor pronóstico y predictivo de esas mutaciones (Zardavas et al. 2014, Lux et al. 2016). El valor predictivo de las alteraciones en *PIK3CA* podría depender tanto del momento y forma de obtención del tejido, así como de la tecnología utilizada para determinar las mutaciones (Sellami et al. 2017). Algunos autores sugieren que el análisis debería focalizarse tanto en los tumores primarios como en las lesiones metastásicas para tener en cuenta la heterogeneidad de la enfermedad, la cual se incrementa a lo largo de la progresión (Eccles et al. 2013). Por otra parte, distintos trabajos señalan que la presencia de mutaciones en *PIK3CA* no siempre se correlaciona con una mayor activación de la vía, evidenciada por mayor fosforilación de algún componente *downstream* como AKT (Stemke-Hale et al. 2008, Beelen et al. 2014, Hashimoto et al. 2014, Lazaridis et al. 2014, Paplomata et al. 2014) o S6 (Noh et al. 2008, Elkabets et al. 2013). Además, **mutaciones en *PIK3CA* no siempre predicen sensibilidad a la inhibición de PI3K** (Mukohara 2015), posiblemente debido a la presencia de otras alteraciones simultáneas que median la resistencia, tanto en otros componentes de la misma vía como en otras vías de señalización (Janku et al. 2012).

Es por eso que el estudio detallado de la desregulación de la vía PI3K/AKT/mTOR, tanto a nivel génico como su correlación a nivel de expresión proteica y de activación, es un factor fundamental para la selección de los pacientes que vayan a recibir este tipo de tratamiento y poder maximizar así la respuesta terapéutica.

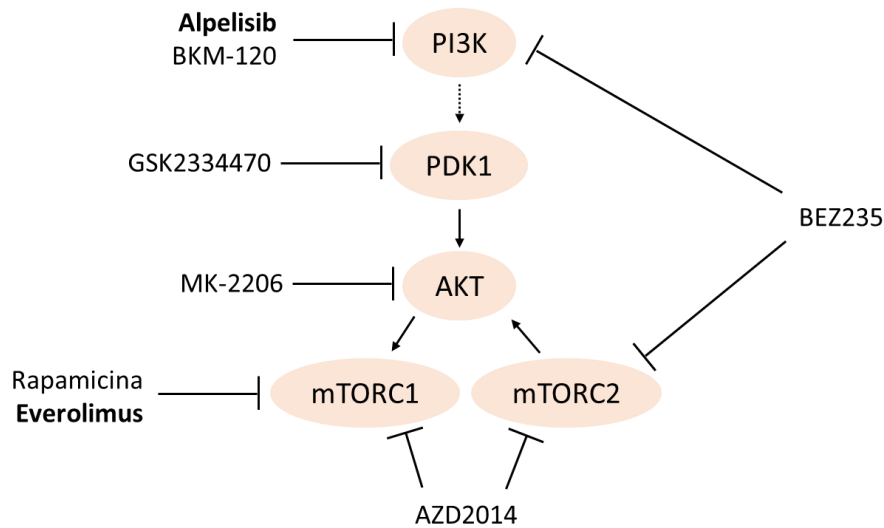


Figura 2. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

Inhibitors/natural products	Target	Disease	Phase
Idelalisib/CAL-101	p110 δ	B cell malignancies	Approved
AMG319	p110 δ	HNSCC	II
Duvelisib (Copiktra)	p110 δ	CLL or SLL	III
Copanlisib (BAY 80-6946)	pan-class I PI3K	Follicular lymphoma	Approved
Alpelisib (BYL719)	p110 α	Diverse cancers	Approved
LY294002	pan-PI3K class I	Pancreatic cancer	
Buparlisib (BKM120)	pan-class I PI3K	Breast cancer	II, III
Pictilisib	pan-class I PI3K	Breast cancer	II
Pilaralisib	pan-class I PI3K	Breast, endometrial cancers	II
AZD6482	p110 β	Glioblastoma	I
GSK2636771	p110 β	Diverse cancers	II
AZD8186	p110 β	Solid tumors	I
IPI-549	p110 γ	Melanoma, pancreatic cancer	I
GDC-0032 (Taselisib)	p110 α , p110 δ , and p110 γ	Lung, breast cancer	I, II
GDC-0077	p110 α	PIK3CA-mutant HR+/HER2- locally advanced or metastatic breast cancer	III
Ipatasertib (GDC-0068)	pan-Akt	Breast, prostate cancer	II, III
AZD5363	pan-Akt	Gastric, prostate cancer	I, II
Afuresertib (GSK2110183)	Akt1 and Akt2	Ovarian cancer	I
MK2206	pan-Akt	NSCLC	II
Temsirolimus (CCI-779)	mTORC1	Renal cell carcinoma	Approved
Everolimus (RAD001)	mTORC1	Renal cancer, HR+ breast cancer	Approved
Sirolimus	mTORC1	Solid tumors	II
Ridaforolimus	mTORC1	Soft-tissue sarcoma	III
CC-223	mTORC1/C2	Lymphoma	II
Vistusertib (AZD2014)	mTORC1/C2	NSCLC, ovarian cancer	II
AZD8055	mTORC1/2	Advanced solid tumors and lymphoma	I
Dactolisib (BEZ235)	dual PI3K/mTOR	Advanced solid tumors	I, II
Voxtalisib (SAR245409, XL765)	Class-I PI3Ks, mTORC1, and mTORC2	Solid tumors	I
Apitolisib (GDC0980)	pan-PI3K and mTORC1/mTORC2	Advanced solid tumors	I
PQR309	pan-PI3K and mTORC1/mTORC2	Solid tumors	I

Figura 3. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR evaluados en ensayos clínicos en distintos tipos de cáncer. Tabla adaptada de (Yu et al. 2021).

▪ **Ciclo celular**

La desregulación de la compleja red que controla la progresión del ciclo celular es una característica distintiva del cáncer (Hanahan et al. 2011). Uno de los principales ejes de la regulación es la entrada al ciclo celular, la cual es controlada por la proteína de retinoblastoma (Rb). Rb restringe la progresión desde la fase G1 a la fase S uniéndose e inhibiendo los factores de transcripción E2F. Esto es revertido mediante la fosforilación de Rb por parte de la quinasa dependiente de ciclina 4 o 6 (CDK4/6), la cual se activa por unión con ciclinas de tipo D. La fosforilación de Rb conduce a la liberación de E2F y a la activación de un programa transcripcional de proliferación, conduciendo a la célula a abandonar G1. A continuación, ocurre una cascada de eventos de señalización que promueven la actividad de los complejos ciclina E/CDK2, la fosforilación de proteínas blanco y la progresión hacia la fase S y replicación del ADN (Kato et al. 1993, Burkhart et al. 2008) (Figura 4).

La entrada al ciclo celular es reprimida por dos familias de inhibidores de CDK, INK4 (como p16), que inhiben CDK4/6 induciendo arresto del ciclo celular y senescencia (Kim et al. 2006) y CIP/KIP (como p21 y p27) que inhiben tanto los complejos de CDK4/6 como los de CDK2 (Sherr et al. 1999).

La expresión de ciclinas de tipo D es inducida en respuesta a señales mitogénicas a través de cascadas de señalización como la vía PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPK. Estas ciclinas conectan las señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular, siendo la ciclina D1 la que se encuentra asociada predominantemente con la tumorigénesis humana (Hosokawa et al. 1998).

La desregulación del eje ciclina D1/CDK4/6/Rb por aumento de la actividad de complejos ciclina/CDK y/o la disminución de supresores son características de muchos tipos de tumores. Es por eso que este eje es un blanco clave para la intervención terapéutica en cáncer (Musgrove et al. 2011).

▪ **Inhibidores de ciclo celular para el tratamiento de tumores resistentes endócrinos**

La mayoría de los tumores resistentes endócrinos presentan el eje ciclina D/CDK4/6/Rb alterado en algún punto, haciéndolos susceptibles al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 (Ertel et al. 2010).

Estudios preclínicos demostraron que el palbociclib, inhibidor de CDK4/6, inhibe preferentemente la proliferación de tumores de mama ER+ en contraste con tumores ER- en modelos experimentales *in vitro* (Finn et al. 2009). Ensayos clínicos de fase III mostraron que la combinación de la terapia con inhibidores de CDK4/6 y terapia endócrina para el cáncer de mama avanzado ER+, mejora la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en comparación con la terapia hormonal sola. Palbociclib fue el primer inhibidor de CDK4/6 en ser aprobado por la FDA en 2015, a partir de los resultados de los estudios PALOMA-1

y PALOMA-2. En primera instancia, fue aprobado en combinación con letrozole para el tratamiento en primera línea del cáncer de mama avanzado ER+ HER2- (Finn et al. 2015, Finn et al. 2016). En 2016 la FDA aprobó su uso para el tratamiento del cáncer de mama avanzado ER+ HER2- también en combinación con fulvestrant luego de progresión a la terapia hormonal, a partir de los resultados del ensayo PALOMA-3 (Cristofanilli et al. 2016) (Figura 4). Este estudio arrojó una mejoría en la sobrevida global de 28.0 meses (grupo fulvestrant) a 34.9 meses (grupo fulvestrant + palbociclib), y en la sobrevida libre de progresión de 4.6 meses (grupo fulvestrant) a 9.5 meses (grupo fulvestrant + palbociclib).

Más recientemente fue aprobado el uso de dos nuevos inhibidores de CDK4/6, el ribociclib y el abemaciclib, tanto en primera como en segunda línea para el cáncer de mama avanzado ER+ HER2-, a partir de los resultados de los ensayos clínicos MONALEESA-2 y -3 (Hortobagyi et al. 2016, Hortobagyi 2018, Slamon et al. 2018) y MONARCH-1, -2 y -3 (Dickler et al. 2017, Goetz et al. 2017, Sledge et al. 2017).

Como ya fue mencionado, uno de los inconvenientes en la clínica es que **no se dispone de marcadores predictivos de respuesta terapéutica validados para este tipo de tratamientos selectivos**. Más allá de la presencia de ER y PR, o el índice de Ki67, hasta el momento no existen biomarcadores validados que puedan predecir la respuesta a inhibidores de CDK4/6 (Ma et al. 2017).

Al igual que con el tratamiento hormonal como monoterapia, el desarrollo de resistencia a estos inhibidores es un proceso que ocurre frecuentemente (Xu et al. 2017, Condorelli et al. 2018). En los ensayos que llevaron a la FDA a aprobar estos inhibidores, al menos 1 de cada 3 pacientes recayeron a la terapia con inhibidores de CDK4/6 dentro de los 2 años. En el ensayo PALOMA-2 más del 70% de los pacientes tratados con palbociclib en combinación con letrozole presentaron progresión de la enfermedad a los 40 meses (Finn et al. 2016).

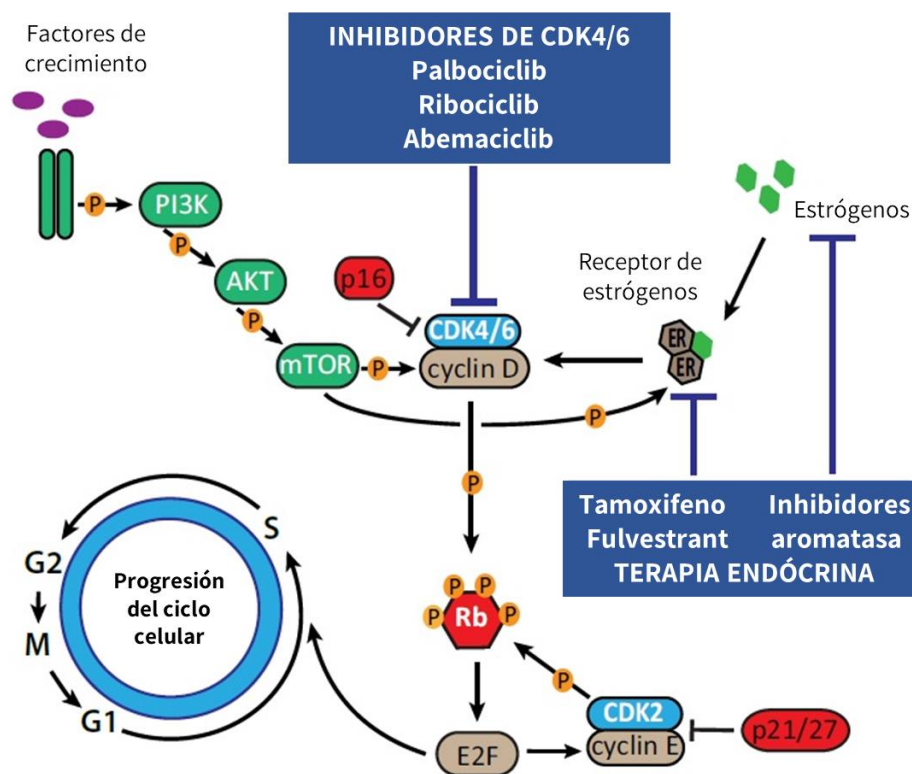


Figura 4. Inhibidores hormonales y de CDK4/6. Adaptado de (Portman et al. 2019).

▪ **Interacciones entre el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb y la vía de PI3K/AKT/mTOR**

Existen distintos puntos de interacción descritos entre la vía de PI3K/AKT/mTOR y el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb. La vía de PI3K/AKT/mTOR regula la traducción de ciclina D1 (Liang et al. 2003, Averous et al. 2008, Steelman et al. 2011) a través de mTOR y la fosforilación de sus proteínas blanco como 4E-BP1 y S6K (Inoki et al. 2005, Lang et al. 2005) (Figura 5). Algunos estudios demuestran además que el complejo ciclina D1/CDK4/6 promueve la activación de mTORC1 a través de la fosforilación e inhibición de TSC2, proteína que forma parte del complejo TSC1/TSC2, inhibidor directo de mTORC1. Esto promueve la fosforilación de los sustratos de mTORC1 4E-BP1 y S6K, efectores claves del crecimiento celular. A través de este mecanismo, CDK4/6 promovería no solo la proliferación celular directamente a través de la fosforilación de Rb, sino también indirectamente a través de la activación de mTORC1 que favorece el crecimiento celular, lo cual es requerido para la progresión del ciclo celular (Zacharek et al. 2005, Romero-Pozuelo et al. 2020) (Figura 5). Por el contrario, otros autores demuestran que Rb en su estado hiperfosforilado se une a la proteína Sin1, componente del complejo mTORC2, previniendo

así la fosforilación de AKT y de esta forma inhibiendo la activación de mTORC1 (Zhang et al. 2016, Bonelli et al. 2017) (Figura 5).

Distintos trabajos a su vez señalan a la **activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR como un posible mecanismo de escape a inhibidores de CDK4/6**, y muestran la efectividad de la combinación de inhibidores de esta vía con inhibidores de CDK4/6 en modelos de líneas celulares y PDXs (Herrera-Abreu et al. 2016, Jansen et al. 2017, Michaloglou et al. 2018). Como mencionamos anteriormente, el alpelisib (inhibidor de PI3K α) fue aprobado para tumores avanzados ER+ HER2- con *PIK3CAmut* que progresaron al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 a partir del ensayo clínico SOLAR-1. Actualmente la terapia combinada de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con inhibidores de CDK4/6 está siendo evaluada en diversos ensayos clínicos de cáncer de mama y cáncer de páncreas (NCT02389842, NCT02985125), así como también la combinación de terapia hormonal con inhibidores de PI3K/AKT/mTOR en pacientes que recayeron a la terapia con inhibidores de CDK4/6 (NCT03056755, NCT03803761)(Hamilton et al. 2016, Cortes et al. 2017, Ballinger et al. 2018).

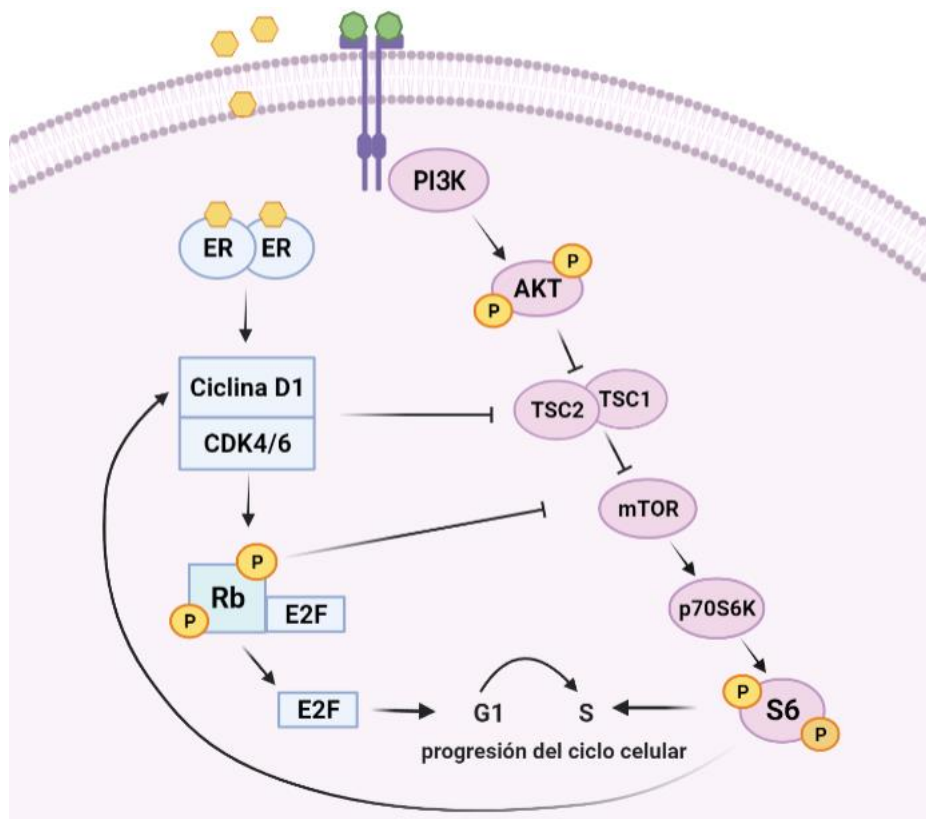


Figura 5. Interacciones entre la vía de PI3K/AKT/mTOR y el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb. Existen múltiples puntos de interacción entre ambas vías. Algunos ejemplos son la inhibición del complejo TSC2/TSC1 por el complejo ciclina D1/CDK4/6, la inhibición de mTORC2 por pRb y la estimulación sobre la síntesis de ciclina D1 por la vía de PI3K/AKT/mTOR.

- **Mecanismos de resistencia a inhibidores hormonales y de CDK4/6**

La resistencia endócrina ocurre cuando los tumores logran evadir la inhibición del ciclo celular producida por la terapia hormonal y recuperan su capacidad proliferativa. La inhibición de CDK4/6 actúa directamente río abajo de la terapia endócrina, es por eso que es inevitable que algunos de los mecanismos de resistencia sean comunes a ambos tratamientos. La resistencia endócrina asociada a la desregulación del eje Rb podría, en teoría, reducir la sensibilidad a la inhibición de CDK4/6.

Actualmente se conocen distintos mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia endócrina (Figura 6) y a inhibidores de CDK4/6 (Figura 7) asociados con el cáncer de mama y otros tipos, algunos de los cuales se resumen a continuación, en base a las revisiones de (AlFakeeh et al. 2018, Pandey et al. 2019, Szostakowska et al. 2019, Hanker et al. 2020, Xi et al. 2020).

➤ **Resistencia endócrina**

- **Alteraciones del ER.** Pérdida de la expresión del ER en alrededor del 10% de los tumores resistentes endócrinos (Shiino et al. 2016). Mutaciones en *ESR1* hasta en un 39% de tumores resistentes (Merenbakh-Lamin et al. 2013, Robinson et al. 2013, Toy et al. 2013, Jeselsohn et al. 2015, Spoerke et al. 2016). Translocaciones y fusiones de *ESR1* (Hartmaier et al. 2018) que mantienen la actividad transcripcional del receptor en ausencia de ligando.
- **Sobreexpresión de factores de crecimiento o de sus receptores.** Amplificación de HER-2 (Borg et al. 1994, Newby et al. 1997, Riggins et al. 2007, Arpino et al. 2008). Mutaciones activantes de HER-2 (Razavi et al. 2018, Croessmann et al. 2019, Nayar et al. 2019). Amplificación de EGFR, IGFR y FGFR (Brockdorff et al. 2003, Knowlden et al. 2005, Giltnane et al. 2017, Razavi et al. 2018, Levine et al. 2019).
- **Alteraciones genéticas o epigenéticas en vías de sobrevida.** Conducen a sobreactivación de las vías y pueden reactivar la transcripción mediada por ER en ausencia de estradiol. Alteraciones en distintas proteínas de la vía de PI3K/AKT/mTOR (Faridi et al. 2003, deGraffenried et al. 2004, Musgrove et al. 2009, Miller et al. 2010, Razavi et al. 2018) como por ejemplo mutaciones activantes de la subunidad catalítica de PI3K (Isakoff et al. 2005, Mukohara 2015, O'Leary et al. 2018) o pérdida de la expresión del supresor tumoral PTEN (Fu et al. 2014). Alteraciones de la vía de MAPK/ERK (Fribbens et al. 2018, Griffith et al. 2018, Razavi et al. 2018, Sokol et al. 2019, Pearson et al. 2020). Aumento en la expresión de PKC α (Lin et al. 2006, Li et al. 2012).
- **Alteraciones en reguladores del ciclo celular.** Sobreexpresión de reguladores positivos del ciclo celular como MYC, ciclina E1 y D1 (Span et al. 2003, Butt et al. 2005). Disminución de la expresión de inhibidores de CDK como p27 o p21 e inactivación de Rb (Perez-Tenorio et al. 2006, Chu et al. 2008).

- **Alteraciones en reguladores transcripcionales** como MYC, FOXA1, CTCF, TBX3 y HOXB7 (Jin et al. 2015, Razavi et al. 2018, Fu et al. 2019). Reprogramación epigenética que altera el acceso a la cromatina (Stone et al. 2015, Patten et al. 2018).
- **Sobreexpresión de proteínas involucradas en la transición epitelio-mesenquimal** como nicastrin and Notch4 (Lombardo et al. 2014, Faronato et al. 2015). Expansión de células con fenotipo *stem* (Rodriguez et al. 2019). Aumento de la expresión de SOX2, SOX9 y FOXM1 (Bergamaschi et al. 2014, Piva et al. 2014, Jeselsohn et al. 2017, Leung et al. 2017).
- **Alteraciones en componentes del microambiente tumoral.** Sobreexpresión de factores reguladores de hipoxia HIF-1 (Yang et al. 2015, Morotti et al. 2019). Alteraciones en los componentes de la matriz extracelular (Jallow et al. 2019). Alteraciones en la función de fibroblastos asociados al cáncer (CAF) que reducen expresión de ER y activan RTKs (Brechtbuhl et al. 2017). Alteración en la producción de citoquinas por células inmunes e inflamatorias (Joffroy et al. 2010).
- **Alteraciones en la expresión de miRNAs** que activan vías de crecimiento alternativas o inhiben la expresión de ER (Campos-Parra et al. 2017). Aumento de expresión de miRNAs que reprograman el metabolismo de aminoácidos y activan autofagia para promover resistencia endócrina (Bacci et al. 2019).



Figura 6. Mecanismos de resistencia a inhibidores endócrinos.

➤ Resistencia a inhibidores de CDK4/6

- **Pérdida de la función de Rb** debido a mutaciones o deleciones, tanto en modelos preclínicos (Finn et al. 2009, Dean et al. 2010, Herrera-Abreu et al. 2016) como en estudios clínicos (Ma et al. 2017, Condorelli et al. 2018, O'Leary et al. 2018). Esto conduciría a la activación del eje E2F/Ciclina E/CDK2. Sin embargo, las mutaciones en *RB1* son poco frecuentes en tumores primarios (Cancer Genome Atlas 2012, Ma et al. 2017) o en cáncer de mama metastásico previo al tratamiento con inhibidores de CDK4/6. Por lo general son adquiridas solo en una minoría de pacientes post tratamiento y son frecuentemente policlonales (Lefebvre et al. 2016, Condorelli et al. 2018, Li et al. 2018, O'Leary et al. 2018).
- **Mutaciones o amplificación del gen de *CDKN2A*** (p16INK4A, inhibidor de CDK4/6). Esto conduce a un aumento en la activación de la vía tanto en presencia como en ausencia de Rb. La sobreexpresión de p16 en simultáneo con la pérdida de función de Rb implica menor respuesta a inhibidores de CDK4/6 (Dean et al. 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de p16 en presencia de Rb funcional confiere resistencia a inhibidores de CDK4/6 debido a disminución de CDK4, proteína blanco del inhibidor.
- **Amplificación/sobreexpresión de CDK4** (Wu et al. 2011, Cen et al. 2012, Olanich et al. 2015) o **CDK6** en líneas celulares luego de un tratamiento prolongado con inhibidores de CDK4/6 (Herrera-Abreu et al. 2016, Yang et al. 2017, Cornell et al. 2019). La sobreexpresión de CDK6 disrumpe la señalización del ER, conduciendo además a resistencia endócrina (Alves et al. 2016, Yang et al. 2017).
- **Amplificación/sobreexpresión de ciclina E**, la cual activa CDK2 y la fosforilación de Rb, evadiendo a CDK4/6 para entrar al ciclo celular (Asghar et al. 2015, Asghar et al. 2017). Fue observada tanto en estudios preclínicos (Herrera-Abreu et al. 2016, Yang et al. 2017, Cornell et al. 2019) como en análisis retrospectivo de tejidos tumorales (Guarducci et al. 2018, Turner et al. 2019).
- **Activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR** (Hernandez-Aya et al. 2011, Herrera-Abreu et al. 2016, Zhang et al. 2016, Jansen et al. 2017), **de la vía de MAPK/ERK** (de Leeuw et al. 2018) **y amplificación o mutación de FGFR** (O'Leary et al. 2018, Formisano et al. 2019).
- **Expresión reducida de ER/PR**. Se observó tanto en líneas celulares como en biopsias de tumores de pacientes tratados con inhibidores de CDK4/6. Esta menor expresión de ER/PR se asoció además a una menor capacidad de respuesta a los inhibidores hormonales (Yang et al. 2017, Ono et al. 2021).
- **Mutaciones con pérdida de función de FAT1** en el 6% de los tumores previo a la terapia con inhibidores de CDK4/6. La pérdida de FAT1 induce la expresión del gen de CDK6 vía la inhibición de la vía de Hippo y la activación de YAP/TAZ (Li et al. 2018).

- **Alteraciones en la expresión de miRNAs.** Aumento en la expresión de CDK6 a través de supresión de la vía de TGF- β mediada por miRNAs (Cornell et al. 2019). Desregulación de miRNAs asociados con sensibilidad o resistencia a inhibidores de CDK4/6 (Andrikopoulou et al. 2021).



Figura 7. Mecanismos de resistencia a inhibidores de CDK4/6.

- **Stemness y resistencia a terapias**

Si bien hoy en día existen diversas opciones terapéuticas para los distintos subtipos de tumores de mama, como mencionamos en las secciones anteriores, un alto porcentaje de pacientes eventualmente recaen a estos tratamientos. A nivel celular, existen evidencias de que existen pequeñas subpoblaciones intratumorales de células pluripotentes, es decir, con capacidad de dar origen a un nuevo tejido o tumor, característica conocida como *stemness*. Estas células tumorigénicas, conocidas como células madre tumorales o *cancer stem cells* podrían ser las responsables de la resistencia a las terapias convencionales y contribuir a la recaída y progresión de la enfermedad, favoreciendo la aparición de metástasis (Shiozawa et al. 2013, Li et al. 2015). Estas células presentan la capacidad de autorenovarse desreguladamente y diferenciarse, muestran alto grado de tumorigenicidad y resistencia terapéutica, potencial metastásico y activación de vías de señalización aberrantes (Michor et al. 2010, Chen et al. 2013).

En particular en cáncer de mama, distintos grupos de investigación han reportado la participación de SOX2 y de otros marcadores de *stemness* en el desarrollo de resistencia a tamoxifeno en líneas celulares y tumores humanos (Piva et al. 2014, Gwak et al. 2017, Leung et al. 2017). Pocos trabajos estudiaron hasta el momento el efecto de palbociclib, terapia más

reciente, sobre el fenotipo *stem*. Un ejemplo es el trabajo de (Chen et al. 2019), donde se observa un aumento en marcadores de *stemness* en líneas MCF-7 resistentes a palbociclib. Por otra parte, se ha reportado la participación de la vía de PI3K/AKT/mTOR como regulador de la expresión de SOX2 en cáncer de pulmón y próstata (Dogan et al. 2014, Li et al. 2014). Algunos trabajos incluso sugieren que la inhibición de la vía de PI3K/AKT/mTOR, en especial a nivel de mTOR, podría reducir la propagación de células madre en glioblastoma (Mendiburu-Elicabe et al. 2014). Sin embargo, hasta el momento no hay suficientes estudios en cáncer de mama sobre la participación de la vía de PI3K/AKT/mTOR en modificar el fenotipo *stem*.

▪ Modelos experimentales

Como se mostró anteriormente, hasta el momento se han publicado distintos trabajos que describen mecanismos de resistencia a tamoxifeno y a palbociclib en modelos experimentales. Sin embargo, el conocimiento actual de los mecanismos moleculares de resistencia a estos inhibidores está lejos de estar completo y se basa principalmente en la realización de estudios con agente único utilizando cultivos de líneas celulares.

Con respecto a la resistencia hormonal, la mayoría de los estudios se basan en la generación de líneas celulares resistentes a partir de una deprivación constante de estrógenos (long-term estrogen deprivation, LTED). Por ello creemos importante contar con líneas celulares con resistencia adquirida al inhibidor hormonal tamoxifeno, por ser este un tratamiento ampliamente utilizado en las pacientes con cáncer de mama, incluso en mujeres pre-menopáusicas.

Con respecto al estudio de la resistencia a inhibidores de CDK4/6, un factor a tener en cuenta es que este tratamiento en cáncer de mama ER+ no se utiliza como monodroga sino en combinación con terapia hormonal, ya sea en primera línea para cáncer de mama metastásico o en segunda línea para pacientes que recaen a la terapia hormonal.

Hasta el momento no hay modelos que permitan estudiar el efecto de ambas drogas, el tamoxifeno y el palbociclib, en simultáneo sobre el desarrollo de resistencia por lo tanto resulta importante estudiar estos mecanismos en un modelo que se asemeje lo más posible a lo que ocurre en la clínica.

▪ Racional para el proyecto que desarrollamos

En base a todo lo expuesto, hemos desarrollado en nuestro laboratorio a partir de las líneas celulares ER+/PR+ de cáncer de mama humano T47D y MCF-7, variantes resistentes a tamoxifeno (TR), a palbociclib (PR), y a ambas drogas (TPR), por presión selectiva con dichos inhibidores por un tiempo prolongado (Figura 8). Para generar las variantes resistentes simples, se trataron las líneas *wild type* por 12 meses con dosis crecientes de tamoxifeno o palbociclib. Luego, a partir de las variantes resistentes a tamoxifeno (TR), y por tratamiento

con palbociclib por 12 meses más, se obtuvieron las variantes doble resistentes (TPR), simulando la secuencia terapéutica utilizada en la clínica. Esto implicó un tiempo total de 24 meses en la generación de esta última línea. Algunos estudios señalan que la adquisición de resistencia es un proceso con varias etapas: una etapa temprana donde las células adquieren cambios adaptativos que pueden afectar la durabilidad de la respuesta, seguida luego por una etapa más larga donde se terminan de establecer los mecanismos de resistencia a largo plazo (Johnston 1997, Herrera-Abreu et al. 2016). Con estos plazos prolongados de selección intentamos evitar analizar las líneas en un proceso temprano de resistencia, muchas veces todavía reversible.

Es importante también tener en cuenta que existe una amplia brecha entre el estudio de una línea celular *in vitro*, aislada del contexto fisiológico real donde crecería un tumor, y el estudio de la misma *in vivo*, donde las células crecerán formando un tumor real en un contexto de matriz extracelular y microambiente más cercano a lo que ocurre en pacientes. Muchos trabajos de resistencia se limitan al estudio en cultivo celular, por lo tanto, consideramos importante evaluar nuestros resultados más relevantes en un contexto *in vivo*, en este caso, creciendo las células como xenotrasplantes en ratones inmunosuprimidos.

Además, para complementar este estudio, realizamos una colaboración con el Laboratorio de Terapéutica Experimental dirigido por la Dra. Violeta Serra en el Instituto de Oncología Vall D'Hebron (VHIO) (Barcelona, España) gracias a una beca de formación en oncología otorgada por la Fundación Bunge y Born. En este estudio utilizamos modelos de xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX) obtenidos a partir de tumores ER+, a partir de los cuales obtuvimos células individuales que fueron utilizadas para realizar ensayos *ex vivo*. Comparamos de esta forma los resultados obtenidos en nuestras líneas celulares con un modelo que representa en mayor medida la heterogeneidad de los tumores mamarios observada en la clínica. Además, estos ensayos nos permitieron evaluar en paralelo distintas combinaciones de inhibidores en cada uno de los cultivos de células derivadas de PDX, lo cual sería difícil de evaluar *in vivo* por el gran número de ratones que implicaría.

Estos modelos experimentales resultaron herramientas útiles para estudiar los mecanismos involucrados en la resistencia adquirida y el papel de las vías de señalización, en particular la vía PI3K/AKT/mTOR, en este tipo de resistencia. La utilización de estos modelos nos permite no solo proponer estrategias terapéuticas con más información preclínica sino también aportar al hallazgo de posibles marcadores predictivos de resistencia terapéutica que en el futuro puedan ser utilizados en la práctica clínica.

HIPÓTESIS

- Los mecanismos de resistencia adquiridos por células seleccionadas con tamoxifeno o palbociclib de forma individual coinciden con los mecanismos adquiridos por células seleccionadas con ambos inhibidores de forma secuencial.
- El desarrollo de resistencia tanto a tamoxifeno como a palbociclib implica una desregulación/sobreactivación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.
- La adición de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR a la terapia con palbociclib aumenta la respuesta terapéutica.
- Los resultados obtenidos en líneas celulares son extrapolables a modelos de PDX.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue aportar al conocimiento sobre los mecanismos de resistencia terapéutica que ocurren con el uso de las terapias convencionales para los tumores de mama luminales, encontrar posibles marcadores predictivos de dicha resistencia, así como estudiar el rol de la vía PI3K/AKT/mTOR en este proceso. Para ello, generamos líneas celulares de cáncer de mama con resistencia adquirida a tamoxifeno y a palbociclib *in vitro* y utilizamos modelos de xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) **Generar y caracterizar variantes celulares con resistencia adquirida a tamoxifeno (T47D-TR y MCF-7-TR), a palbociclib (T47D-PR y MCF-7-PR) y a ambas drogas (T47D-TPR y MCF-7-TPR):**
 - Analizar la morfología celular de las líneas creciendo *in vitro* en cultivos 2D y 3D.
 - Evaluar la capacidad de formación de mamosferas y la expresión de marcadores de *stemness* y E-cadherina.
 - Analizar la tasa de crecimiento tanto en cultivo celular como creciendo *in vivo* en ratones inmunosuprimidos.
 - Analizar la capacidad migratoria e invasiva mediante ensayos de *transwell* y evaluación histológica de los tejidos tumorales y metástasis pulmonares obtenidos *in vivo*.

- Analizar la expresión de receptores hormonales, proteínas del ciclo celular y activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.
- Realizar una secuenciación de exoma completo para evaluar la adquisición de nuevas mutaciones o alteraciones genómicas.
- Analizar el efecto sobre la expresión del receptor de estrógenos y activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR al retirar las drogas de selección.

2) Analizar la sensibilidad de las líneas a inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y sus combinaciones con palbociclib:

- Comparar el efecto del tratamiento con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR que actúan a distintos niveles de la misma.
- Analizar *in vitro* el efecto de la combinación de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib e inhibidores hormonales.
- Ensayar *in vivo* las mejores combinaciones de tratamientos obtenidas *in vitro*.
- Analizar el efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular, tanto *in vitro* como en los tumores tratados *in vivo*.
- Analizar el efecto de palbociclib sobre la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

3) Caracterizar PDXs provenientes de pacientes con cáncer de mama ER+, sensibles y resistentes a tamoxifeno y palbociclib:

- Analizar la sensibilidad a tamoxifeno, palbociclib, alpelisib y everolimus en ensayos *ex-vivo*.
- Evaluar la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y expresión de proteínas del ciclo celular.
- Analizar la sensibilidad a la combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y hormonales en ensayos *ex-vivo*.
- Analizar el efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS EN CULTIVO CELULAR

- **GENERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A TAMOXIFENO Y PALBOCICLIB**

Utilizamos las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y MCF-7 para generar líneas resistentes a tamoxifeno, palbociclib y a ambas drogas por presión selectiva con dichos inhibidores. Para generar las variantes resistentes a tamoxifeno (T47D-TR y MCF-7-TR) y resistentes a palbociclib (T47D-PR y MCF-7-PR) cultivamos células T47D y MCF-7 *wild type* en presencia del inhibidor de ER tamoxifeno o del inhibidor de CDK4/6 palbociclib durante 12 meses. En el caso de las variantes doble resistentes (T47D-TPR y MCF-7-TPR), las variantes resistentes a tamoxifeno T47D-TR y MCF-7-TR ya generadas fueron tratadas con palbociclib durante 12 meses más (Figura 8). Se partió desde una concentración inicial de 0,01 uM de los inhibidores hasta una concentración final de 1 uM. Las drogas fueron agregadas al medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las líneas T47D y MCF-7 (ver Apéndice). La concentración de las drogas se incrementó progresivamente, manteniendo una concentración determinada hasta observar que las células comenzaban a dividirse nuevamente. Alcanzada esta instancia, se fueron aumentando las dosis hasta alcanzar la concentración final máxima de 1 uM. Luego de finalizar la selección, las variantes generadas fueron mantenidas en presencia de las correspondientes drogas de selección en su dosis máxima. La administración de las mismas se interrumpió 24-48 horas antes de realizar los experimentos particulares.

Las variantes MCF-7 resistentes fueron utilizadas para validar algunos resultados relevantes en las T47D o para realizar los experimentos que no fueron posibles en las T47D, como fueron los ensayos de migración.

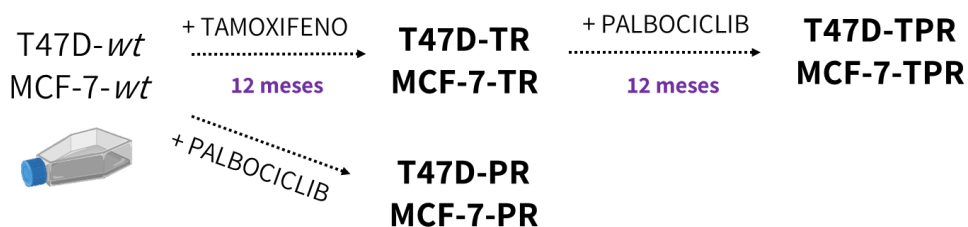


Figura 8. Generación de líneas celulares resistentes en cultivo celular.

- **ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN / CONTEO CELULAR**

Se sembraron entre 10.000 y 20.000 células por pocillo en placas P24. El número inicial de células fue ajustado en base a la tasa de división celular de cada variante. Las células fueron plaqueadas en su medio de mantenimiento habitual, pero en ausencia de las drogas de selección. A las 48 horas se cambió el medio a 7% suero fetal bovino (SFB) en DMEM/F12 conteniendo las drogas y/o vehículo. Se utilizó ese porcentaje de suero completo en el medio de tratamiento para favorecer la división celular. Los tratamientos se mantuvieron durante 7 días, renovando el medio y las drogas día por medio. Una vez transcurrido ese tiempo, las células fueron levantadas con igual volumen de Tripsina-EDTA y contadas utilizando contador de células *Countess II* (Thermofisher). Cada experimento fue repetido como mínimo 2 veces, con un mínimo de 4 réplicas para cada tratamiento.

- **EXTRACTOS PROTEICOS Y WESTERN BLOT**

- **EXTRACTOS PROTEICOS EN CONDICIONES BASALES**

Plaqueamos las células en placas P60 con su medio de cultivo habitual, en presencia de las drogas de selección. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se incubaron las células durante 24 horas en DMEM/F12 sin suero (T47D) o 2% SFB (MCF-7) para evaluar vías de señalización y en 7% SFB para evaluar la expresión de ciclinas, en ambos casos en ausencia de las drogas de selección. Pasadas las 24 horas, descartamos el medio y realizamos 2 lavados con PBS 1X frío, colocando las placas sobre hielo. Para realizar el extracto incorporamos 100 ul de *buffer* RIPA + inhibidores de proteasas y fosfatasa (ver Apéndice). Levantamos las células con la ayuda de un *scraper*. Los extractos fueron conservados en freezer a -80°C hasta su cuantificación y siembra en geles de poliacrilamida. Los extractos fueron cuantificados mediante el kit de cuantificación de proteínas BCA (ThermoFisher). Antes de la siembra en geles, los extractos fueron centrifugados a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm y posteriormente calentados durante 5 minutos a 100°C con *loading buffer* 1X (ver Apéndice).

- **EXTRACTOS PROTEICOS LUEGO DE TRATAMIENTOS**

Plaqueamos las células en placas P6 con su medio de cultivo habitual, pero en ausencia de las drogas de selección. A las 48 horas se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se agregó como medio de tratamiento 2% SFB o 7% SFB (dependiendo el ensayo) junto con las drogas diluidas previamente en el medio. Los tratamientos fueron realizados a distintos tiempos según el ensayo, renovando el medio y los tratamientos día por medio. Luego de transcurrido el tiempo de tratamiento, procedimos a realizar los extractos de igual forma que

para extractos basales, pero en este caso utilizando 50 μ l por pocillo de *buffer* RIPA + inhibidores de proteasas y fosfatasa.

➤ WESTERN BLOT

Sembramos entre 20 y 25 μ g de proteína por calle. Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. La corrida se realizó a 100 V constantes hasta la caída del frente de corrida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa previamente incubadas en *buffer* de transferencia. La transferencia se realizó durante 1,5 horas a 100 V constantes. Las membranas fueron bloqueadas con 5% leche descremada en TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas con TBS-Tween e incubadas *overnight* en agitación a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes según el caso (Figura 11). A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween, y las membranas fueron incubadas por 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos de dichas membranas con TBS-Tween. Finalmente, las proteínas fueron reveladas en cuarto oscuro mediante la técnica de ECL (*Enhanced Chemiluminescence*). Para visualizar la señal, las membranas fueron expuestas a una placa radiográfica tipo AGFA durante el tiempo necesario. Las placas reveladas fueron escaneadas utilizando un escáner digital para luego cuantificar la intensidad de las bandas de interés con el programa *ImageJ*.

• ENSAYO DE CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se plaquearon las células en placas P6 en su medio de cultivo habitual, pero en ausencia de las drogas de selección. Luego de 48 horas el medio fue retirado y las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y ayunadas por 24 horas en DMEM sin suero. Transcurrido ese tiempo se retiró el medio, se agregó medio fresco con 10% SFB y se incubaron por 24 horas más. Pasado ese tiempo, las células fueron tripsinizadas hasta obtener células individuales, lavadas con PBS 1X y fijadas con etanol 70° utilizando vortex para evitar la formación de cúmulos. Las células fijadas en etanol fueron conservadas a 4°C hasta el momento de su utilización. Previo al ensayo, las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS 1X, para luego ser incubadas con una solución de yoduro de propidio (IP) 20 μ g/ml y RNAsa 100 μ g/ml por 1 hora. Las células fueron pasadas por el citómetro de flujo hasta obtener un conteo aproximado de 10.000 eventos por línea celular. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa *FlowJo10*.

- **INMUNOFLUORESCENCIA**

- **CULTIVOS 2D**

Las células fueron plaqueadas sobre vidrios con su medio de cultivo habitual, pero en ausencia de las drogas de selección. A las 48 horas las células fueron fijadas con etanol 70° por 30 minutos a -20°C o con 4% paraformaldehído (PFA) en PBS 1X por 15 minutos a temperatura ambiente, dependiendo del anticuerpo a utilizar. Las células fijadas con PFA fueron lavadas luego con PBS 1X y permeabilizadas con 0,25% Tritón X100 en PBS 1X. Se realizó un bloqueo con 10% SFB en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron preparados en solución de bloqueo e incubados *overnight* a 4°C en cámara húmeda (Figura 11). Los anticuerpos secundarios fueron preparados en solución de bloqueo e incubados por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, protegidos de la luz. A continuación, se incubó con faloidina-TRITC diluida en PBS 1X (según el caso) por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego de lo cual los vidrios fueron incubados con DAPI por 15 minutos a temperatura ambiente. Los vidrios fueron montados con medio Vectashield (VECTOR), sellados con esmalte y conservados a -20°C hasta su utilización. Las imágenes fueron analizadas con el microscopio confocal Olympus DSU IX83. Las fotos correspondientes fueron tomadas con el programa *CellSens Dimensions*. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por solución de bloqueo.

- **CULTIVOS 3D**

Plaqueamos 10.000 células de cada línea celular en cámaras de 8 pocillos, con un *coating* previo de 70 ul de Geltrex (ThermoFisher), utilizando el medio de cultivo habitual para cultivos en 2D, en ausencia de drogas de selección. Transcurridas 48 horas las células fueron fijadas con una solución de 4%PFA-20% sacarosa en PBS 1X por 15 minutos a temperatura ambiente para conservar la estructura de los cúmulos formados, y luego lavadas 3 veces con PBS 1X. A continuación, las células se incubaron con faloidina-TRITC diluida en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS 1X y se tiñeron los núcleos con DAPI por 15 minutos, para finalmente montar los vidrios con medio Vectashield (VECTOR) y sellar con esmalte. Los preparados se conservaron a -20°C y se analizaron con el microscopio confocal Olympus DSU IX83. Las fotos correspondientes fueron tomadas con el programa *CellSens Dimensions*.

- **ENSAYO DE CRECIMIENTO EN SUSPENSIÓN (MAMOSFERAS)**

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Células Madre del IBYME, con ayuda de la Dra. Paula Marks y el Dr. Luciano Vellón. El protocolo utilizado se basó en modificaciones del protocolo original de Dontu y colaboradores (Dontu et al. 2003). Se utilizaron placas P6 previamente tratadas con solución de poli-2-hidroxietilmetacrilato (poli-HEMA) para evitar la adhesión celular a la placa. Se sembraron 3.000 células/ml en 3 ml de medio de cultivo para mamoesferas (Ver Apéndice), en ausencia de inhibidores de selección. Cada 2-3 días se adicionó 0,5 ml de medio fresco con el equivalente de factores de crecimiento para el volumen total de cada pocillo. A los 8 días se tomaron fotos en campo claro de las esferas formadas utilizando el microscopio Olympus CKX41.

- **ENSAYO DE DILUCIÓN LÍMITE PARA CUANTIFICACIÓN DE MAMOSFERAS (ELDA)**

Para una cuantificación más precisa de las mamoesferas se utilizó una modificación del ensayo de dilución límite (*Extreme Limiting Dilution Assay*, ELDA), que permite calcular mediante análisis estadístico la frecuencia de formación de mamoesferas por número de células sembradas, asumiendo que se trata de esferoides clonales y no multicelulares (Hu et al. 2009). En placas de P96 cubiertas con solución de poli-HEMA se sembraron 200 ul de suspensiones celulares en concentraciones decrecientes de células por cada pocillo (300, 100, 30 y 10 células) en el medio de cultivo para mamoesferas. Se cultivaron las células por 7 días, adicionando 50 ul de medio y factores cada 2 días, y se contó en el microscopio la cantidad de eventos positivos, representados por la presencia de, al menos, una esfera en cada pocillo. Finalmente, se ingresó el número de células (*Dose*), la cantidad de pocillos ensayados en cada condición (*Tested*) y la cantidad de eventos positivos (*Response*) en la herramienta bioinformática disponible online en (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>) para la cuantificación de unidades formadoras de esferas, es decir, para calcular la frecuencia de células madre o progenitoras en las líneas estudiadas con su correspondiente análisis estadístico (Figura 9).

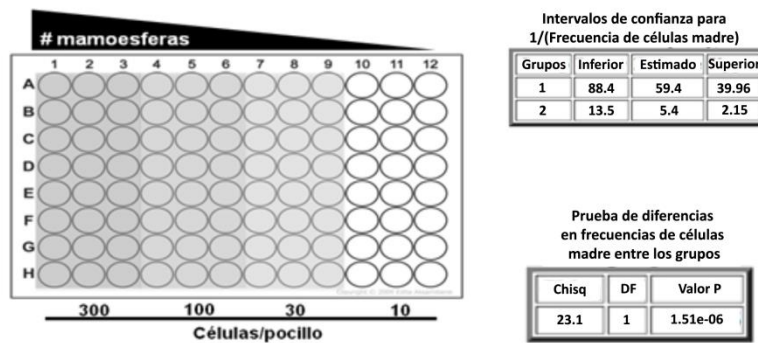


Figura 9. Ensayo de ELDA. Se muestra el diseño de la placa P96 y los números de células sembradas. El análisis da como resultado la frecuencia de células madre o progenitoras. En el ejemplo se observa una frecuencia de 1/59.4 para el grupo 1 y 1/5.4 para el grupo 2.

- **ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR EN *TRANSWELL***

Se sembraron las células en su medio de cultivo habitual, pero en ausencia de los inhibidores de selección. A las 48 horas se lavaron las células con PBS 1X, se cambió el medio a 2% SFB y se incubaron por 24 horas más. A continuación, se tripsinizaron las células y se sembraron 50.000 células diluidas en 200 ul de DMEM sin suero, en la parte superior de insertos con poro de 8 um (Biofil) para placas de 24 pocillos. Por debajo del inserto se colocaron 500 ul de medio 10% SFB de manera de crear un gradiente para que las células puedan migrar. Al cabo de 24 horas se fijaron las células con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Se removieron las células que no invadieron, es decir, las que quedaron del lado superior del inserto, y se cuantificaron las células que se adhirieron a la cara inferior del inserto.

- **EXTRACTOS DE RNA Y RT-qPCR**

- **EXTRACCIÓN DE RNA**

Se sembraron las células en placas P60 en su medio de cultivo habitual, pero en ausencia de los inhibidores de selección. A las 48 horas se cambió el medio a 7% SFB y se incubó por 24 horas. Transcurrido ese tiempo las células fueron lavadas con PBS 1X y se lisaron por agregado de 1 ml de *TriReagent* (Genbiotech). Los lisados se conservaron en freezer a -80°C hasta la extracción de RNA.

Para la extracción de RNA se procedió a realizar el método de separación de fases por agregado de cloroformo. Brevemente, se adicionó a cada muestra 200 ul de cloroformo. Se vortexeó y centrifugó a 4°C por 15 minutos y luego la fase acuosa superior fue recolectada

en un nuevo eppendorf. El RNA fue precipitado por agregado de 500 ul de isopropanol e incubación a -20°C *overnight*. El pellet obtenido fue lavado cuatro veces con etanol 75° y luego resuspendido en agua libre de RNAsas para su conservación a -80°C. El RNA se cuantificó utilizando el equipo Nanodrop.

➤ RT-qPCR

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total mediante retrotranscripción utilizando la enzima *RevertAid Reverse Transcriptase* (ThermoScientific) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, en un tubo se colocaron 2 ug de RNA, 0,5 ug de Oligo(dT) y agua tratada con DEPC hasta llegar a un volumen final de 12,5 ul. Los tubos fueron incubados 5 minutos a 65°C y luego 2 minutos en hielo. En otro tubo se preparó una mezcla compuesta por dNTPs 10 mM y la enzima retrotranscriptasa con su respectivo *buffer* 1X. Se agregaron 7,5 ul de mezcla a cada tubo de reacción. Por último, se incubaron las muestras por 60 minutos a 42°C, seguido de una inactivación de 10 minutos a 70°C. En cada reacción se realizaron controles sin enzima, para corroborar que no haya amplificación genómica. El cDNA se conservó a -20°C.

La medición de los niveles de mRNA se realizó por PCR en tiempo real con el equipo Biorad C1000 Touch Thermal Cycler. Para la realización de la qPCR, se utilizó el mix *FastStart Universal SYBR Green Master* (ROX, Roche) en un volumen final de reacción de 15 ul por pocillo. A la mezcla de reacción se agregaron los *primers* de interés en las concentraciones adecuadas para cada caso (entre 0,2-0,4 uM), la muestra de interés y agua en un volumen final de 15 uL. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyeron en cada reacción controles negativos de PCR (control de agua y de amplificación de DNA genómico). La amplificación se realizó siguiendo el siguiente programa: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 1 minuto. Los niveles de expresión de los transcritos de los genes evaluados fueron estimados mediante el método de $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH como gen endógeno para la normalización. Las secuencias de cada par de *primers* utilizados se detallan en la figura 10.

<i>Primers</i>	<i>Secuencia Forward</i>	<i>Secuencia Reverse</i>
SOX2	CATGGACAGTTACGCGCACAT	TGGGCGAGCCGTTTCATGTAG
KLF4	GAAAAGGACCGCCACCCACA	ACGGTAGTGCCTGGTCAGTT
NANOG	ATGCAACCTGAAGACGTGTG	AGGCTCCAACCATACTCCAC
OCT4	GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA	GGAAAGGGACCGAGGAGTAC
BCRP	CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA	TCCATATCGTGGAATGCTGAAG
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GTCATTGATGGCAACAATATCCACCT

Figura 10. Secuencias de los *primers* utilizados.

- **SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO**

- **PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO**

Se extrajo el DNA genómico de las líneas T47D-*wt* y sus variantes resistentes, mediante el uso de un kit comercial *EasyPure Genomic DNA* (TransGen Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa 1,5% a fin de evaluar la calidad de la purificación, y fueron cuantificadas mediante Nanodrop y método fluorométrico (Qubit). El DNA genómico obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

- **SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO**

Las muestras fueron enviadas a secuenciar a la empresa NOVOGENE, quienes llevaron a cabo el siguiente protocolo. A partir de 1 ug de DNA genómico se construyeron las bibliotecas de secuenciación correspondientes. Se utilizó el kit *SureSelect Human All ExonV6* (Agilent Technologies, CA, USA) que permite estudiar aproximadamente 21.000 genes y 350.000 regiones codificantes del genoma humano. Según instrucciones del fabricante, en una primera instancia el DNA genómico fue fragmentado químicamente, y posteriormente, en una sucesión de pasos, los fragmentos codificantes fueron enriquecidos con sondas de oligonucleótidos específicas provistas por el kit comercial antes mencionado. La secuenciación de las bibliotecas fue llevada a cabo en una plataforma *Illumina HiSeq 2500* con una cobertura promedio de 70x.

➤ ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Fue realizado en colaboración con la Lic. Valeria Salinas y el Bioq. Andrés Elía. Se alineó el producto de las corridas de secuenciación con la secuencia de referencia del genoma humano del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (versión GRCh38/hg38) utilizando la herramienta *Burrows-Wheeler Alignment* (BWA) (Li et al. 2009). Posteriormente, para el filtrado de variantes se utilizó la versión 4.1.4.0 de *Genomic Analysis Toolkit* (GATK) siguiendo las mejores prácticas (Van der Auwera et al. 2013). Para la detección de variantes nucleótido único (SNV) y pequeñas inserciones/deleciones (INDELs) de tipo germinal se utilizó *HaplotypeCaller* y para las variantes somáticas *Mutect2*. El archivo VCF fue anotado en varios niveles utilizando la herramienta *ANNOVAR* (Wang et al. 2010). Las variantes fueron clasificadas considerando las recomendaciones de *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al. 2015). Para la priorización y análisis de variantes se utilizó la herramienta *RStudio*. Las mutaciones fueron filtradas por patogenicidad utilizando los predictores REVEL, SIFT, Polyphen2 y CLNSIG según (https://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/protein_function.html).

ENSAYOS *IN VIVO*

• ANIMALES

Utilizamos ratones hembra NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null (NSG) de *The Jackson Laboratory* de aproximadamente dos meses de edad y criados en el Bioterio del IByME. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 23°C. Los animales fueron manipulados según normas internacionales acordes con la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (*Institute of Laboratory Animal Resources*, 1996), aprobadas por el Comité de Ética Institucional (CE027/2017).

• OBTENCIÓN DE TUMORES A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

Inoculamos subcutáneamente aproximadamente 8×10^6 células de cada línea celular resuspendidas en Geltrex (en proporción 2:1) en el flanco lateral de ratones NSG, adyacente a la cuarta glándula mamaria. Dependiendo el experimento, y para estimular el crecimiento de los tumores, 24 horas previas a la inoculación de las células se colocó un pellet subcutáneo de 0,25 mg de 17β -estradiol. Evaluamos el tamaño tumoral dos o tres veces por semana

utilizando un calibre Vernier (largo x ancho, mm²), y el peso de los ratones 1 vez por semana hasta el sacrificio.

- **TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES ENDÓCRINOS, PALBOCICLIB Y RAPAMICINA**

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 30 mm² (entre 15-20 días desde la inoculación de las células) se comenzaron los distintos tratamientos según el caso. La administración de tamoxifeno (5 mg/kg 5 veces por semana), fulvestrant (5 mg por inyección 1 vez por semana) y palbociclib (25 mg/kg 5 veces por semana) se realizó de forma subcutánea (s.c.), utilizando como vehículo solución fisiológica. La administración de rapamicina (17,5 mg/kg dos veces por semana) se realizó de forma intraperitoneal (i.p.) utilizando como vehículo 5,2% Tween80-5,2% PEG400 en PBS 1X. Los tratamientos fueron realizados por 15-21 días. Finalizado ese tiempo, se sacrificaron los animales y se pesaron los tumores para comparar con el tamaño tumoral final registrado en las curvas. Una porción de los mismos fue conservada a -80°C y otra porción fue fijada con formalina al 4% en PBS 1X para ser luego incluida en parafina para realizar análisis de la histología tumoral y estudios de inmunohistoquímica. Se extrajeron además hígados y pulmones para la evaluación de toxicidad y focos metastásicos. Ninguna de las drogas utilizadas presentó toxicidad a las dosis ensayadas.

- **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Cortes tumorales de 5 um realizados en micrótopo fueron desparafinados en xileno *overnight* y rehidratados por pasajes sucesivos en soluciones de etanol/agua destilada en concentración decreciente (etanol 100%, 96% y 70%). A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% en 70% etanol durante 30 minutos. Para la recaptura de los antígenos incubamos los cortes con *buffer* citrato 10mM pH=6 (ver Apéndice) durante 50 minutos en baño térmico a 90°C. Luego de 3 lavados con PBS 1X bloqueamos con 2,5% seroalbúmina bovina (BSA) en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los cortes histológicos fueron incubados con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo *overnight* a 4°C en cámara húmeda (Figura 11). Realizamos 3 lavados de 10 minutos en PBS 1X e incubamos con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Realizamos 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X e incubamos con complejo Avidina Biotina (ABC) durante media hora a temperatura ambiente en cámara húmeda (ABC kit Vectastain VECTOR). Luego de 3 lavados con PBS 1X procedimos a revelar los anticuerpos. Las reacciones antígeno-anticuerpo fueron detectadas revelando con 3-3'diaminobencidina (DAB, DAKO). Para contrastar la marca positiva, los núcleos fueron

teñidos con hematoxilina (Biopur). Los cortes deshidratados fueron incubados con xileno, para luego ser montados en medio sintético (DPX, Sigma Aldrich). Para cada anticuerpo se procesaron las muestras a comparar entre sí, en el mismo momento y en iguales condiciones de procedimiento. Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por solución de bloqueo. Los cortes histológicos se observaron con un microscopio Nikon Eclipse E800. Las fotos se tomaron con una máquina digital Nikon asociada al microscopio utilizando el programa *ACT-2U*.

ENSAYOS A PARTIR DE PDXs

- **OBTENCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES A PARTIR DE PDXs**

Esta práctica se realizó en el Laboratorio de Terapéutica Experimental dirigido por la Dra. Violeta Serra en el Instituto de Oncología Vall D'Hebron (VHIO) en Barcelona, España, con el asesoramiento de la Dra. Marta Palafox. Se recolectaron tumores de PDXs en medio de cultivo DMEM/F12/HEPES, mediante cirugía. Los tumores fueron disgregados mecánicamente con bisturí hasta obtener una mezcla lo más homogénea posible. Se agregó luego medio de digestión (Ver Apéndice) para digerir enzimáticamente por 1 hora a 37°C en agitador a 200 rpm. A continuación, se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 10 ml de DMEM/F12 al pellet y se volvió a centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Se resuspendió el pellet en 10 ml de DMEM/F12 y se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de tripsina-EDTA y se resuspendió suavemente por 3 minutos. Se agregaron 10 ml de PBS 1X frío suplementado con 2% SFB y 2% HEPES. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se removió el sobrenadante y se agregaron 2 ml de dispasa (5 mg/ml) y 300 ul de DNAsa I (1 mg/ml) a 37°C. Se resuspendió el pellet por 1-3 minutos y se agregaron 8 ml de PBS 1X frío. Se centrifugó nuevamente a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 2 ml de *RBC Lysis Buffer* 1X para lisar eritrocitos. Luego se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 10 ml de PBS 1X, se centrifugó una vez más a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C y por último se resuspendieron las células en medio de cultivo para ensayos *ex-vivo* (Ver Apéndice).

- **ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A DROGAS**

Se sembraron 60.000 células por pocillo en cámaras de 8 pocillos, previamente tratadas con un *coating* de 30 ul de Matrigel. Se colocó un volumen final de 300 ul de medio de cultivo para *ex-vivos* en cada pocillo. Luego de 48 horas de sembradas las células, se

comenzaron los tratamientos por 7 días, recambiando medio y drogas día por medio. El último día se tomaron fotos de varios campos para cada tratamiento y control con vehículo. Se midió el tamaño de las esferas formadas con el programa *Image J*. Cada tratamiento se realizó por duplicado. El medio condicionado de los cultivos fue recolectado y conservado a -20°C con la idea de realizar determinaciones de microRNAs liberados al medio en un estudio posterior.

- **EXTRACTOS PROTEICOS**

Se sembraron entre 750.000 y 1.000.000 de células por pocillo de P12 previamente tratado con *coating* de Matrigel. Los extractos en condiciones basales fueron realizados 48 horas luego de sembrar las células. En el caso de los extractos con tratamientos, 48 horas luego de sembrar las células se agregó medio fresco con los tratamientos correspondientes y/o vehículo, se incubó por otras 30 horas y luego se realizó el extracto. Para realizar los extractos se colocó la placa sobre hielo. Se retiró el medio y se agregaron 500 ul de PBS-EDTA 5 mM frío sobre las células en Matrigel. Se despegó bien el Matrigel de la placa con la ayuda de un *tip* y se incubó en hielo por 20 minutos. Se levantó el medio y se pasó a un tubo eppendorf. Se agregaron 500 ul más de PBS-EDTA y se incubó 20 minutos más. Luego se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó *buffer* RIPA + inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubó 10 minutos más en hielo y se centrifugó a máxima velocidad para eliminar el pellet. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo y se conservó a -20°C hasta su utilización. Los extractos fueron cuantificados y analizados por western blot de igual forma que para líneas celulares.

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS

ANTICUERPO	MARCA Y CATÁLOGO	DILUCIÓN UTILIZADA
ERα	Santa Cruz, HC-20x sc-543	1/5000 (WB)
PR	Santa Cruz, H-190 sc-7208	1/500 (WB)
AR	Abcam, ab-74272	1/1000 (WB)
pRB Ser 807/811	Cell Signaling, #8516	1/1000 (WB), 1/200 (IHQ)
pRB Ser 780	Cell Signaling, #8180	1/1000 (WB)
Rb	Cell Signaling, #9309	1/2000 (WB)
Ciclina D1	ThermoFisher, #RM-9104-S1	1/3000 (WB)
Ciclina E1	Cell Signaling, #4129	1/1000 (WB)
Ciclina E2	Cell Signaling, #4132	1/1000 (WB)
Ciclina A	Santa Cruz, H-432 sc-751	1/500 (WB)
Ciclina B1	Cell Signaling, #4138	1/1000 (WB)
CDK4	Cell Signaling, #12790	1/1000 (WB)
CDK6	Cell Signaling, #3136	1/1000 (WB)
CDK2	Santa Cruz, M2 sc-163	1/500 (WB)
CDK1	ThermoFisher, #33-1800	1/1000 (WB)
PI3K p110β	Santa Cruz, C-8 sc-376641	1/500 (WB)
pPTEN	Cell Signaling, #9554	1/1000 (WB)
PTEN	Cell Signaling, #9188	1/1000 (WB)
pAKT Thr 308	Cell Signaling, #4056	1/1000 (WB)
pAKT Ser 473	Cell Signaling, #4060	1/1000 (WB)
AKT	Cell Signaling, #4685	1/1000 (WB)
pS6 Ser 240/244	Cell Signaling, #2215	1/2000 (WB), 1/500 (IHQ), 1/250 (IF)
pS6 Ser 235/236	Cell Signaling, #2211	1/2000 (WB)

S6	Cell Signaling, #2217	1/2000 (WB)
pERK	Santa Cruz, E-4 sc-7383	1/1000 (WB)
ERK 1/2	Santa Cruz, C-9 sc-514302	1/2000 (WB)
PKCα	BD Transduction Laboratories, #610107	1/500 (WB)
E-cadherina	Santa Cruz, H-108 sc-7870	1/100 (IF)
β-Actina	Santa Cruz, C4 sc-47778	1/3000 (WB)
Actina	Sigma, A2066	1/10000 (WB)
β-Tubulina	Sigma, #T0198 clone D66	1/10000 (WB)
Vinculina	Cell Signaling, #13901	1/5000 (WB)
hGAPDH	Abcam, ab128915	1/10000 (WB)

Figura 11. Listado de anticuerpos primarios utilizados.
WB=western blot; IHQ=inmunohistoquímica; IF=inmunofluorescencia.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento *in vitro* se repitió al menos dos veces, con un mínimo de tres réplicas para cada condición. Los experimentos *in vivo* fueron realizados al menos dos veces con un mínimo de 3 ratones por grupo experimental, salvo aclaración particular. Para el análisis estadístico utilizamos el programa *GraphPad Prism* (versión 8.0 para Windows, GraphPad Software Inc.). Las diferencias entre medias de dos condiciones se evaluaron con una prueba “*t*” de *Student*. Las diferencias entre múltiples tratamientos para una misma línea se evaluaron con una prueba ANOVA de un factor. Para comparar entre más de una línea o grupo se realizó un ANOVA de dos factores. Para el análisis de las curvas de crecimiento tumoral se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas.

RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES

PRIMERA PARTE: CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LAS VARIANTES RESISTENTES.

1) Evaluación de la morfología celular.

El primer paso en la caracterización de las líneas resistentes fue evaluar los cambios fenotípicos ocurridos en las mismas durante el proceso de selección. Observamos que, una vez finalizada la selección, las variantes resistentes adquirieron algunas diferencias morfológicas con respecto a las líneas parentales. Como se señala con flechas amarillas en la Figura 12, la variante resistente a tamoxifeno MCF-7-TR presenta mayor atipia celular, es decir, grupos de células pequeñas acompañados de grupos de células de gran tamaño. Las variantes resistentes a palbociclib T47D-PR y MCF-7-PR presentan un tamaño celular ligeramente mayor al de las líneas *wild type*, mientras que en el caso de las variantes doble resistentes T47D-TPR y MCF-7-TPR, observamos mayor irregularidad en el tamaño celular y cúmulos menos compactos, con grupos de células de morfología más ahusada (Figura 12).

En el caso de la selección con palbociclib, durante las primeras etapas observamos tanto en T47D como en MCF-7 un aumento del tamaño celular y aparición de células con morfología de tipo senescente, ya reportado en la bibliografía para el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 (Schmitt 2007, Rader et al. 2013, Herrera-Abreu et al. 2016). A modo de ejemplo se muestran células con morfología de tipo senescente luego de una semana de tratamiento con palbociclib en T47D-*wt* (Figura 13.A, flechas rojas) y el aumento del tamaño celular luego de dos semanas con palbociclib (Figura 13.B). Al finalizar el proceso de selección con palbociclib observamos que las células presentan un tamaño celular ligeramente mayor al de la línea parental. La presencia de algunas células con morfología de tipo senescente se mantuvo incluso luego de finalizar el proceso de selección, y se observó también en el caso de las líneas seleccionadas con tamoxifeno, aunque en menor medida. No hemos avanzado en el análisis del fenómeno de senescencia en esta tesis, pero nos interesaría profundizar esto en el futuro.

Variantes resistentes

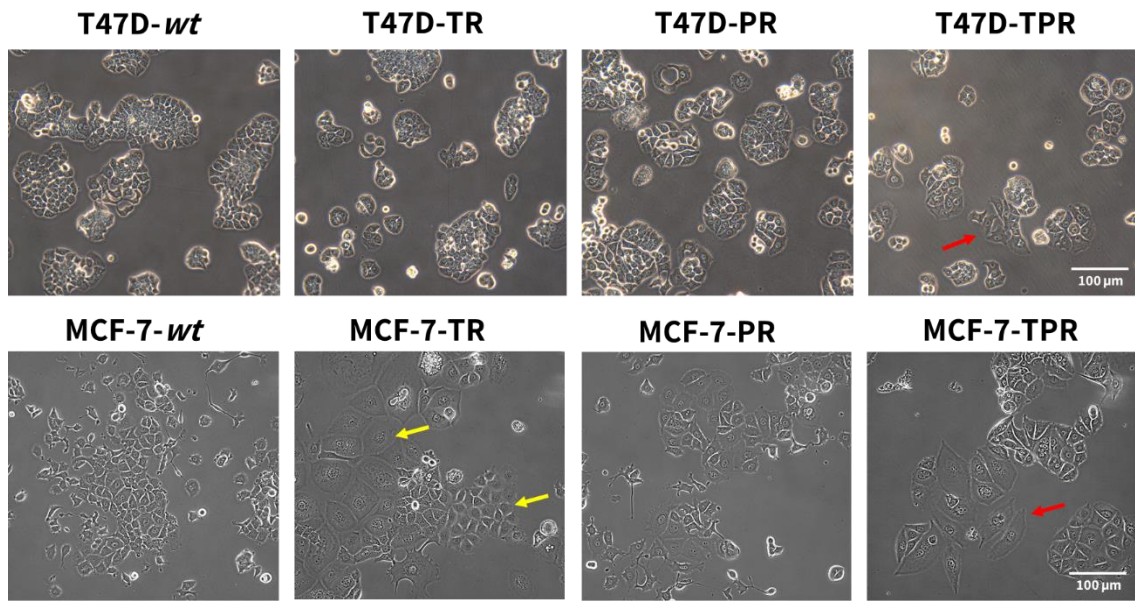


Figura 12. Morfología de las líneas celulares luego de finalizar el proceso de selección. Imágenes de campo claro de las líneas *wild type* y sus variantes resistentes. Se observan grupos de células pequeñas y grupos de células grandes en la variante MCF-7-TR (flechas amarillas) y grupos de células menos compactas y más ahusadas en las variantes T47D-TPR y MCF-7-TPR (flechas rojas).

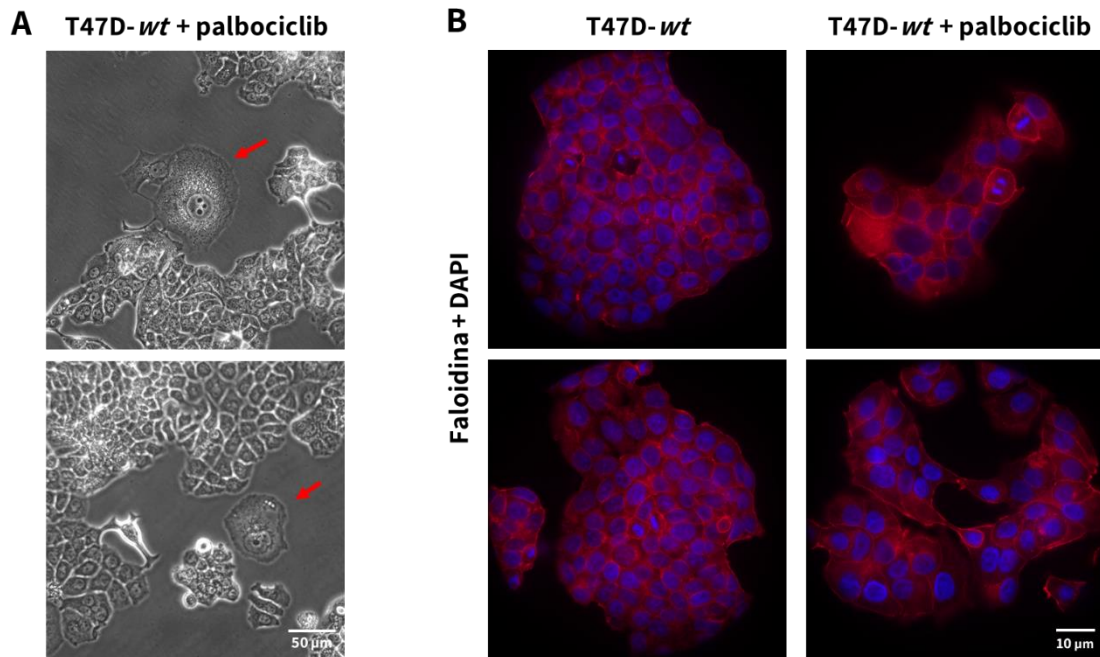


Figura 13. Cambios morfológicos luego del tratamiento con palbociclib. A) Imágenes de campo claro de la línea T47D-*wt* luego de 1 semana de tratamiento con palbociclib. Se observan células con fenotipo de tipo senescente (flechas rojas). B) Imágenes de microscopía confocal luego

de 2 semanas de tratamiento con palbociclib. Las células fueron teñidas con faloidina (rojo) para marcar filamentos de actina y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Las células tratadas con palbociclib son de mayor tamaño que las células sin tratar.

Con el fin de comparar la morfología de las líneas en un contexto de crecimiento tridimensional (3D) sobre una matriz similar a la extracelular, se cultivaron las líneas T47D sobre una fina capa de Geltrex (ThermoFisher). En la Figura 14 se puede observar que creciendo en 3D la línea T47D-*wt* forma esferoides compactos y de mayor tamaño, algunos de los cuales además presentan una luz en su interior cuando son analizados mediante un barrido de imágenes con microscopía confocal. La presencia de esta luz interior se corresponde con un fenotipo más diferenciado y menos agresivo. En el caso de las variantes resistentes, vemos que forman estructuras más pequeñas (T47D-TR) o desorganizadas y con fenotipo similar a un racimo de uvas (T47D-PR y T47D-TPR). Este fenotipo se reportó asociado con una disminución en las uniones célula-célula y un fenotipo más invasivo (Kenny et al. 2007, Han et al. 2010, Cheung et al. 2013, Luca et al. 2013).

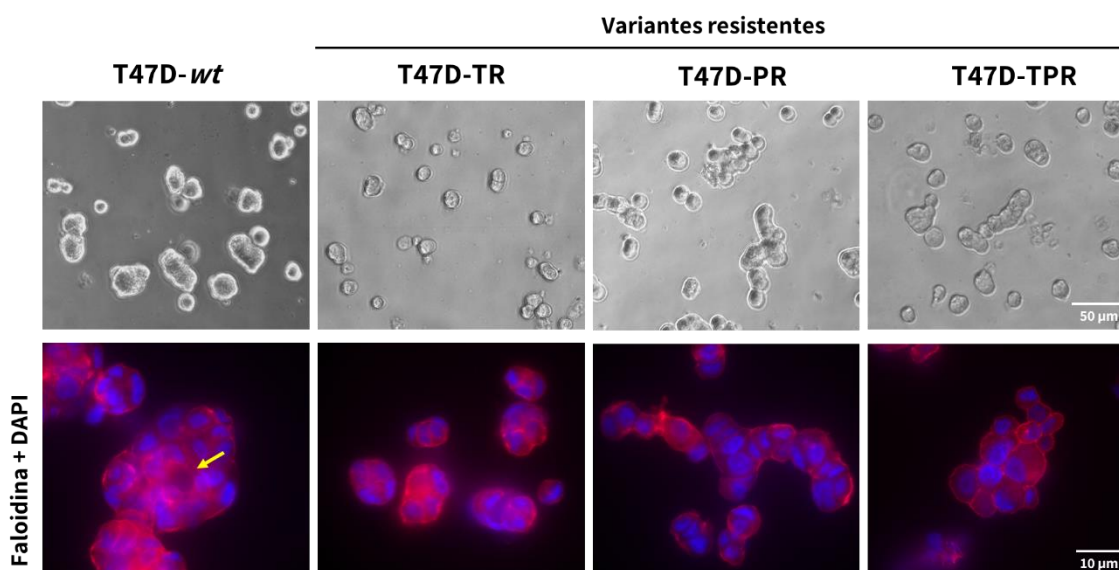


Figura 14. Morfología de las líneas T47D en 3D. Las líneas T47D-*wt* y resistentes fueron cultivadas sobre Geltrex por 48 horas. Panel superior: Imágenes en campo claro. La línea T47D-*wt* forma esferoides más grandes y organizados en comparación con las variantes resistentes. Las líneas T47D-PR y T47D-TPR forman estructuras desorganizadas con fenotipo similar a un racimo de uvas. Panel inferior: Imágenes de microscopía confocal. Los cultivos fueron teñidos para F-actina con faloidina (rojo) y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Algunos de los esferoides que forma la línea T47D-*wt* tienen una luz en su interior (flecha amarilla).

Decidimos evaluar por inmunofluorescencia la expresión de E-cadherina, proteína de unión célula-célula, en las distintas líneas. Observamos que, como era de esperar, las líneas T47D y MCF-7 *wild type* presentan una fuerte marca de E-cadherina en la membrana celular. Por el contrario, las variantes resistentes presentan una menor expresión de esta proteína, principalmente la resistente a palbociclib MCF-7-PR, y llamativamente observamos que la línea resistente a tamoxifeno T47D-TR muestra una localización principalmente nuclear y citoplasmática (Figura 15). Esta menor expresión o localización aberrante de E-cadherina en las variantes resistentes se podría asociar al fenotipo desorganizado observado previamente en 2D y 3D.

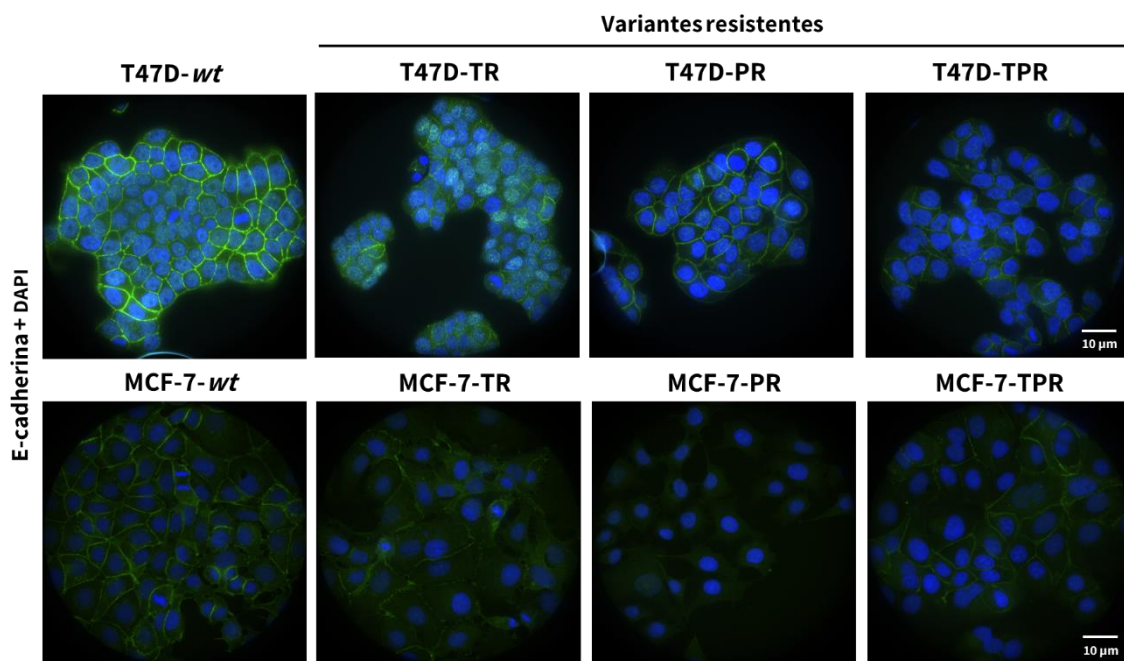


Figura 15. Expresión de E-cadherina en las líneas celulares. Imágenes de microscopía confocal. Se realizó inmunofluorescencia para E-cadherina (verde) y se contratiñeron los núcleos con DAPI (azul). Las variantes resistentes muestran una menor expresión de E-cadherina, mientras que la línea T47D-TR presenta una localización aberrante, principalmente nuclear y citoplasmática.

2) Evaluación de la capacidad de formación de mamosferas y la expresión de marcadores de *stemness*.

El siguiente paso en el proceso de caracterización de las variantes resistentes fue evaluar la presencia de células con características de células madre tumorales. Distintos trabajos sugieren que el desarrollo de resistencia a la terapia hormonal y a la quimioterapia

podría estar asociado al enriquecimiento en células con estas características, las cuales serían menos sensibles a los tratamientos debido a su baja tasa de división celular (Shiozawa et al. 2013, Li et al. 2015, Leung et al. 2017, Phi et al. 2018).

Para realizar este análisis utilizamos dos enfoques diferentes: la realización de ensayos de mamíferas y la medición de la expresión de marcadores de *stemness* mediante RT-qPCR, ambas técnicas reportadas previamente en la literatura (Dontu et al. 2003, Galan et al. 2016). Los ensayos de mamíferas se realizaron en placas donde se impide la adhesión de las células a la misma y en condiciones de ausencia de suero. Únicamente las células con características de células madre tumorales van a ser capaces de crecer y formar esferas en estas condiciones. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Células Madre del IBYME, con ayuda de la Dra. Paula Marks y el Dr. Luciano Vellón. Por el momento solo evaluamos las variantes de la línea T47D en estos ensayos.

Logramos obtener mamíferas para todas las variantes de T47D (Figura 16.A). Observamos que las esferas formadas por la línea *wild type* son más regulares y compactas, mientras que las variantes resistentes forman estructuras irregulares y con una morfología más desorganizada y menos compacta. Esto podría estar asociado a la menor expresión de E-cadherina en estas variantes, ya que esta proteína es necesaria para mantener la cohesión entre células dentro de una esfera (Manuel Iglesias et al. 2013).

Además, cuantificamos la formación de esferas mediante el ensayo de dilución límite o ELDA (Hu et al. 2009). Una mayor frecuencia en la formación de mamíferas estaría asociada con una mayor presencia de células madre tumorales en el cultivo. La variante resistente a tamoxifeno T47D-TR mostró una mayor frecuencia en la formación de mamíferas (Figura 16.B) con respecto a la línea parental, mientras que no observamos diferencias en las variantes T47D-PR y T47D-TPR.

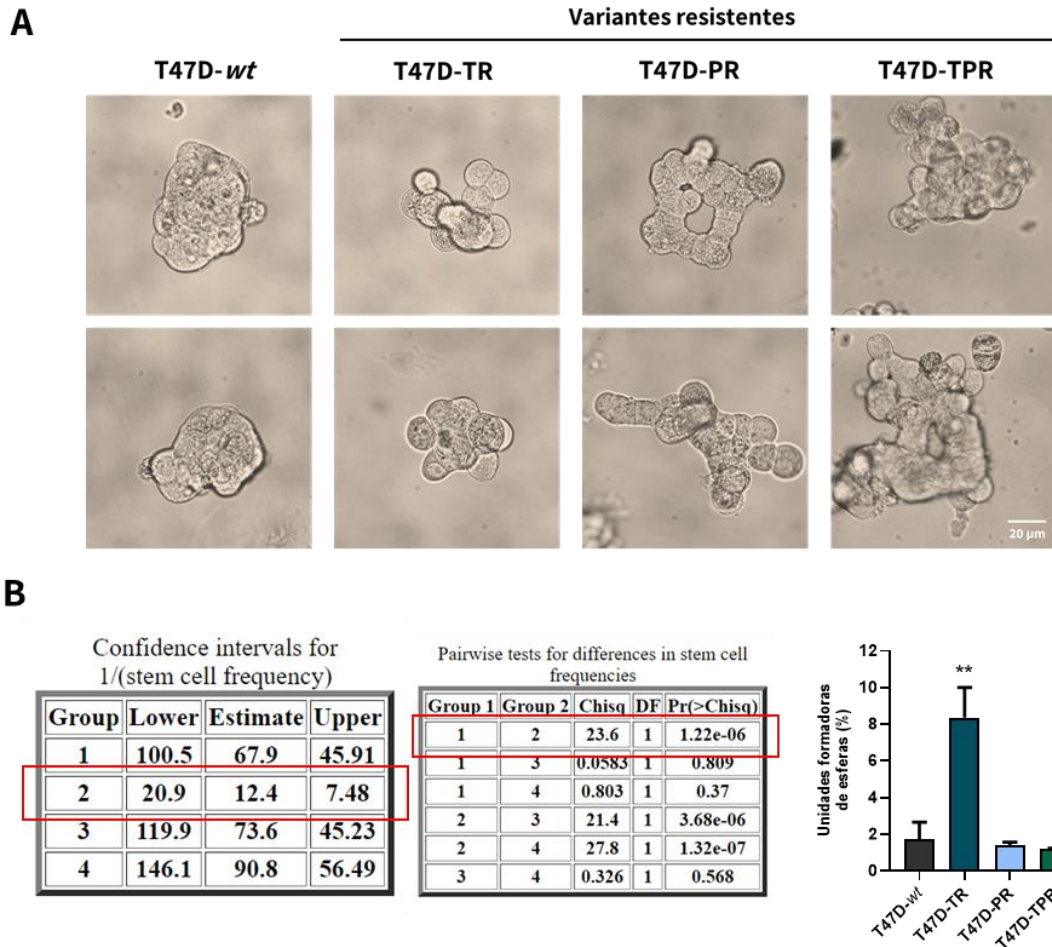


Figura 16. Ensayos de formación de mamosferas. A) Imágenes en campo claro de las esferas formadas por las distintas líneas celulares. Las mamosferas formadas por las variantes resistentes son más irregulares y menos compactas que las formadas por la línea parental. B) Ensayo de dilución límite. Izquierda: Se comparó la frecuencia de formación de esferas entre las líneas T47D-*wt* (Grupo 1), T47D-TR (Grupo 2), T47D-PR (Grupo 3) y T47D-TPR (Grupo 4). Derecha: Se graficó el porcentaje de unidades formadoras de esferas según $\% = 1/\text{Frecuencia} \times 100$. La variante T47D-TR presentó mayor frecuencia en la formación de mamosferas. $**p < 0.01$.

Para completar este estudio analizamos mediante RT-qPCR la expresión de distintos marcadores de *stemness* (SOX2, NANOG, OCT4, KLF4 y BCRP) en las líneas T47D en condiciones de cultivo basal (sin inhibidores de selección). En la Figura 17 se observa una mayor expresión de NANOG y OCT4 en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR, mientras que la línea resistente a palbociclib T47D-PR mostró mayor nivel del transportador de membrana BCRP, proteína involucrada en la resistencia a multidrogas (Nakanishi et al. 2012). En contraposición, encontramos una disminución en SOX2 en todas las variantes resistentes y en KLF4 en la variante doble resistente T47D-TPR. Estos resultados se corresponden con los resultados anteriores, donde el aumento en la capacidad de formación de esferas en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR se asocia con un aumento en

NANOG y OCT4, mientras que las otras variantes resistentes no muestran diferencias con respecto a la línea parental. Esto será discutido en mayor profundidad en la sección Discusión.

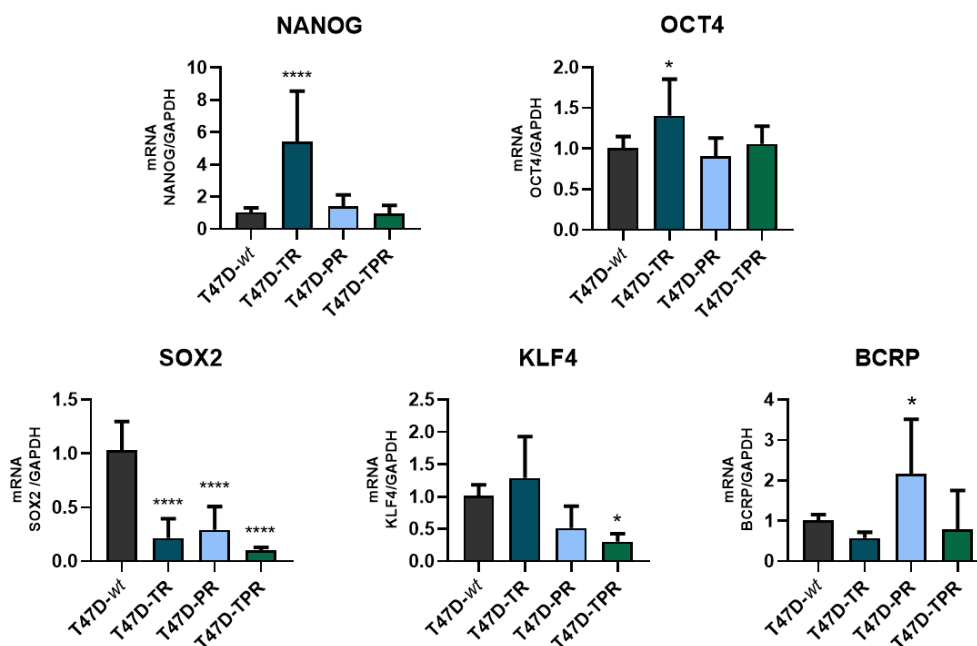


Figura 17. Expresión de marcadores de *stemness* en las líneas celulares. Se midieron los niveles de mRNA de los distintos marcadores por RT-qPCR. La variante T47D-TR presenta un aumento en NANOG y OCT4, mientras que la variante T47D-PR muestra un aumento en BCRP con respecto a la línea parental. Todas las variantes resistentes presentan menor expresión de SOX2. Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de GAPDH en cada variante. * $p < 0.05$ **** $p < 0.0001$.

3) Evaluación de la proliferación y el crecimiento tumoral.

A continuación, evaluamos el crecimiento de las variantes resistentes *in vitro* e *in vivo*. En esta serie de ensayos sólo evaluamos las líneas T47D. Para evaluar el crecimiento en cultivo celular realizamos curvas de proliferación por conteo celular. Las células fueron mantenidas en medio con 10% SFB en ausencia de los inhibidores de selección y recambiando el medio día por medio. Por otro lado, inoculamos 8×10^6 células de cada variante celular en ratones NSG en el flanco lateral adyacente a la glándula mamaria, un día después de la implantación de pellets de 0,25 mg de 17β -estradiol en el flanco opuesto a la inyección de las células. Los tumores fueron medidos con calibre cada 3-4 días hasta los 60

días. Observamos que la línea T47D-*wt* prolifera a una tasa mayor que las variantes resistentes tanto en cultivo celular (Figura 18.A) como en ratones inmunosuprimidos (Figura 18.B), aunque las diferencias en el punto final del ensayo *in vivo* no son significativas, excepto en el caso de la variante doble resistente T47D-TPR, la cual logra formar tumores pequeños pero que no crecen en el transcurso del ensayo.

A su vez, para evaluar la hormono-dependencia de las variantes generadas decidimos analizar el crecimiento de los tumores en ratones sin colocación previa del pellet de estradiol, teniendo en cuenta que la línea T47D-*wt* no crece *in vivo* sin este aporte adicional de hormona. En la Figura 18.C podemos ver que las líneas forman tumores pequeños pero que no logran crecer en ausencia del pellet de estradiol, es decir mantienen su dependencia hormonal. Este último ensayo es preliminar y será repetido en el futuro con un número mayor de ratones por grupo.

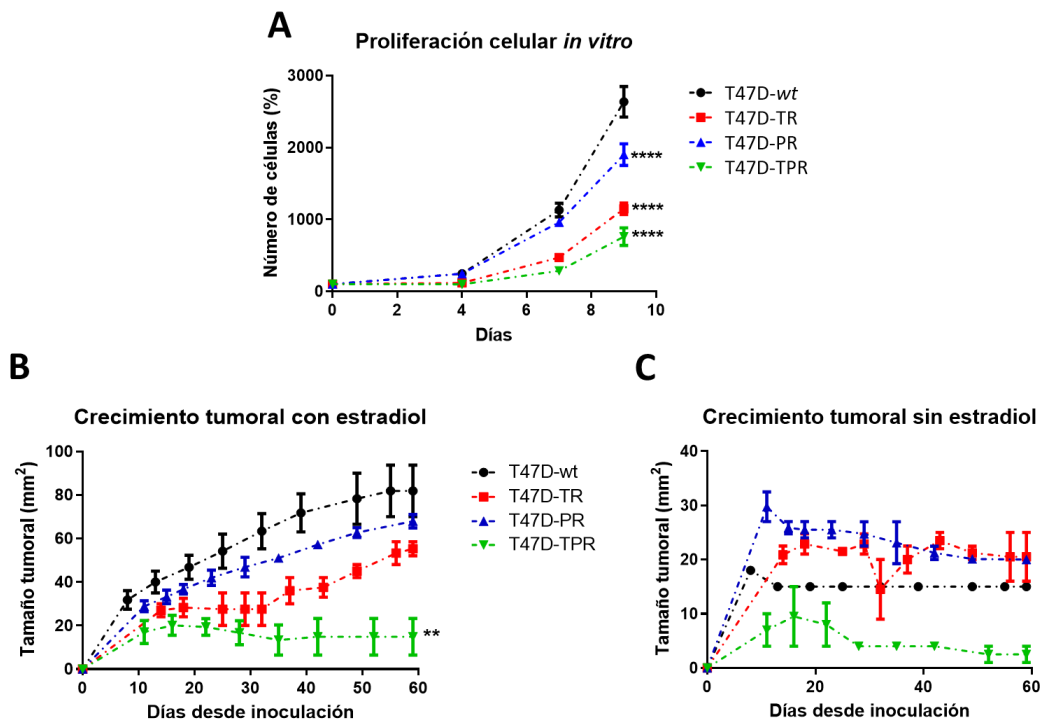


Figura 18. Proliferación y crecimiento tumoral de las líneas celulares. A) Curvas de proliferación celular *in vitro*. Las células fueron cultivadas en medio con 10% SFB y cuantificadas cada 2 días. Las variantes resistentes proliferan a una tasa menor que la línea parental. B) Curvas de crecimiento tumoral en presencia de pellet de estradiol. 8×10^6 células de cada línea celular fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco lateral de ratones NSG. Los tumores resultantes fueron medidos cada 3-4 días. La variante T47D-TPR forma tumores pequeños que no crecen con el tiempo. C) Curvas de crecimiento tumoral en ausencia de pellet de estradiol. Los tumores resistentes no crecen en ausencia de aporte exógeno de estradiol. ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

Para seguir con la caracterización, evaluamos la sensibilidad de las variantes resistentes T47D frente a los inhibidores con los cuales fueron seleccionadas, así como a otros inhibidores análogos, mediante ensayos de proliferación por conteo celular a tiempo final. Como inhibidores del ER utilizamos tamoxifeno (SERM) y fulvestrant (SERD). Como inhibidores de CDK4/6, analizamos palbociclib, ribociclib y abemaciclib. En la Figura 19.A podemos observar que las variantes T47D-TR y T47D-TPR son resistentes tanto a tamoxifeno como a fulvestrant. En el caso de la variante resistente a palbociclib T47D-PR, vemos que presenta sensibilidad a ambos inhibidores endócrinos, pero en menor porcentaje con respecto a la línea parental, posiblemente debido a su menor expresión del ER como se puede observar más adelante en la Figura 23.A.

Por otra parte, al analizar la sensibilidad a inhibidores de CDK4/6, vemos que, si bien las variantes T47D-PR y T47D-TPR responden a palbociclib, ribociclib y abemaciclib, el porcentaje de inhibición es significativamente menor con respecto a la línea T47D-*wt*, siendo este cercano al 80% para palbociclib frente a una inhibición de entre el 15% y 30% en las variantes resistentes. En el caso de la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR, observamos que la misma responde a los tres inhibidores de CDK4/6, pero en menor medida que la línea T47D-*wt* (Figura 19.B). También podemos observar que a una misma dosis de los tres inhibidores (0,1 μ M), todas las líneas presentan un menor porcentaje de inhibición con ribociclib que con palbociclib o abemaciclib, lo cual será discutido en mayor profundidad en la sección de Discusión de esta tesis.

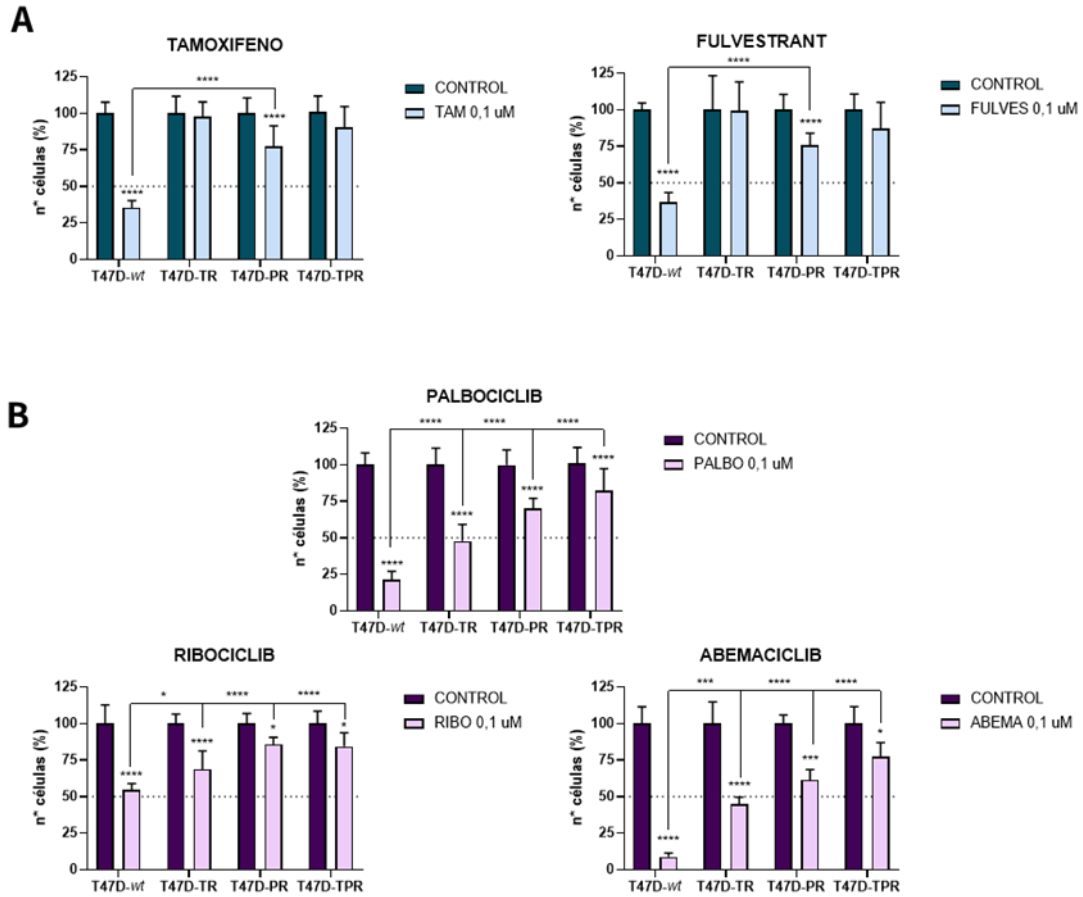


Figura 19. Sensibilidad de las líneas a inhibidores de ER y de CDK4/6. Se realizaron ensayos de proliferación por conteo celular. Las células fueron plaqueadas y tratadas durante 7 días con los inhibidores en concentración 0,1 uM. Se graficó el porcentaje de células final en el control vs. los distintos tratamientos. A) Las variantes T47D-TR y T47D-TPR no responden a tamoxifeno ni fulvestrant, mientras que la variante T47D-PR responde, pero en menor medida que la línea T47D-wt. B) Todas las líneas responden a palbociclib, ribociclib y abemaciclib pero de forma significativamente menor que la línea T47D-wt. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

Inoculamos luego las variantes resistentes en ratones inmunosuprimidos para evaluar su respuesta al tratamiento *in vivo*. Sólo pudimos realizar tratamientos en las variantes T47D-TR y T47D-PR, ya que, como mostramos en la Figura 18.B, la variante T47D-TPR no crece lo suficiente *in vivo* como para evaluar respuesta a tratamientos. Observamos que la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR mantiene su resistencia a esta droga *in vivo*, mientras que, a diferencia de lo observado *in vitro*, responde a fulvestrant (Figura 20.A). Por otro lado, vemos que la variante T47D-PR mantiene su resistencia a palbociclib creciendo *in vivo* (Figura 20.B) La sensibilidad de los tumores a ribociclib o abemaciclib aún no fue evaluada.

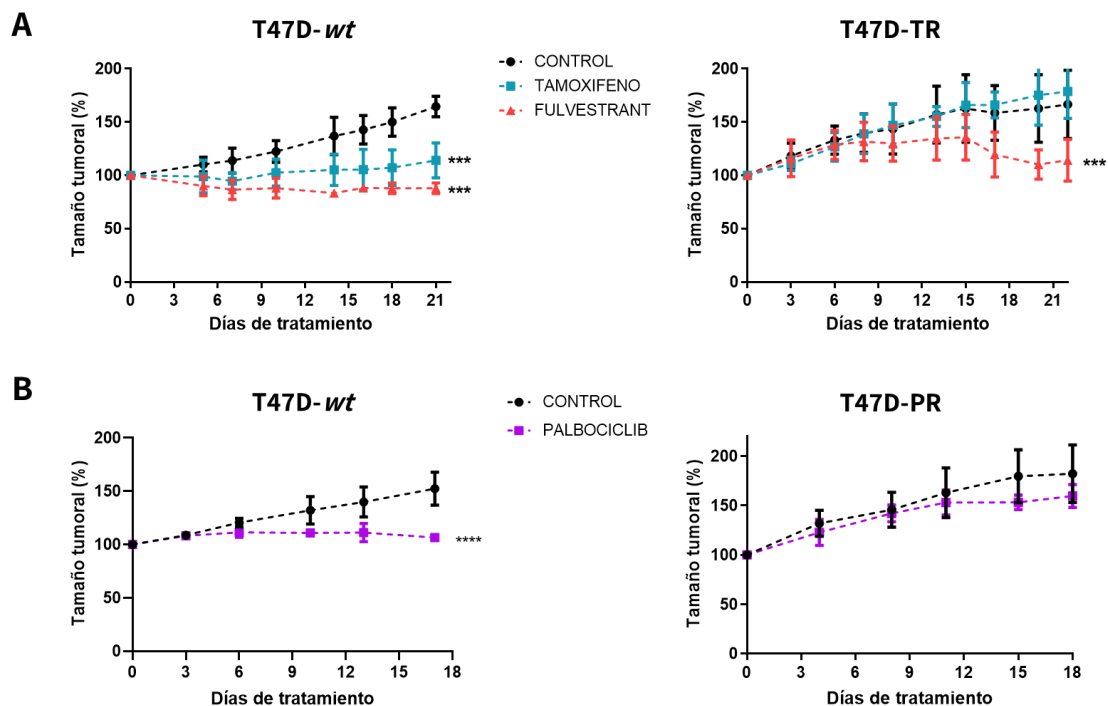


Figura 20. Sensibilidad a inhibidores hormonales y palbociclib *in vivo*. Se inocularon 8×10^6 células de cada variante de forma subcutánea en el flanco lateral de ratones NSG, 24 horas después de la implantación de pellets de estradiol de 0,25 mg. El tamaño tumoral está relativizado al tamaño inicial al momento de comenzar los tratamientos. A) Los tumores T47D-*wt* y T47D-TR fueron tratados con tamoxifeno (5 mg/kg s.c. 5 veces por semana) o fulvestrant (5 mg s.c. 1 vez por semana). Los tumores T47D-TR no responden a tamoxifeno, pero sí lo hacen a fulvestrant. B) Los tumores T47D-*wt* y T47D-PR fueron tratados con palbociclib (25mg/kg s.c. 5 veces por semana). Los tumores T47D-PR no responden a palbociclib como sí responden los tumores T47D-*wt*. *** $p < 0.001$.

4) Análisis de la capacidad migratoria e invasiva.

El siguiente paso en la caracterización de las variantes resistentes fue estudiar su capacidad migratoria e invasiva mediante ensayos *in vitro* y análisis histológico de los tumores y metástasis generados *in vivo*.

No fue posible realizar ensayos de migración por cierre de herida ni en *transwell* en la línea T47D debido a la baja capacidad migratoria de esta línea. Es por eso que realizamos los ensayos de migración en *transwell* con las líneas MCF-7 *wild type* y sus correspondientes variantes resistentes.

Encontramos un aumento en la migración en las variantes resistentes a tamoxifeno MCF-7-TR y a palbociclib MCF-7-PR con respecto a la línea parental, como se puede observar en la Figura 21. La variante doble resistente MCF-7-TPR tiene una capacidad migratoria similar a la línea parental.

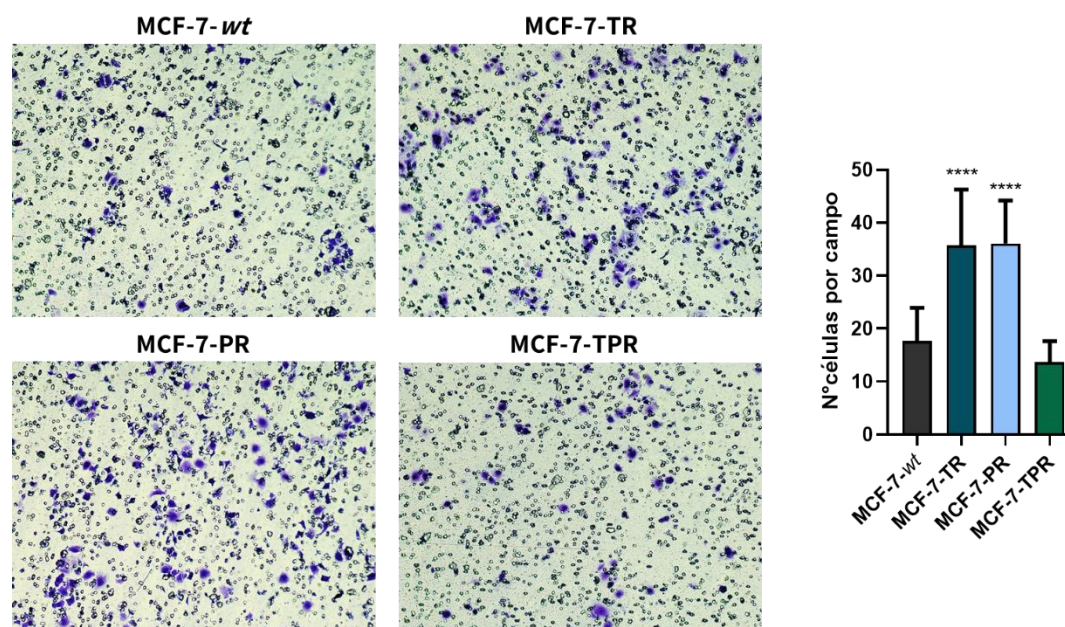


Figura 21. Ensayos de migración en *transwell* en las líneas MCF-7. Las células fueron sembradas en insertos con poro de 8 μ m, formando un gradiente de suero. 24 horas después se cuantificaron las células que fueron capaces de atravesar el inserto y adherirse al otro lado del mismo. Las variantes MCF-7-TR y MCF-7-PR mostraron mayor capacidad migratoria que la línea parental. *** $p < 0.001$.

A continuación, evaluamos histológicamente los tumores formados *in vivo* a partir de las líneas T47D-*wt* y resistentes, y los pulmones de los ratones en condiciones basales (sin tratamiento). Este análisis fue realizado en colaboración con la patóloga Andrea Werbach. Todos los tumores presentaron atipia y pleomorfismo nuclear, es decir, distintos tamaños y formas de células y núcleos, como se puede observar en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de la Figura 22 (panel superior, a-d). Además, podemos observar gran número de mitosis en los tumores T47D-*wt* y T47D-PR (flechas amarillas), y la presencia de desmoplasia estromal principalmente en los tumores T47D-TR, es decir, gran proporción de estroma rodeando a las células tumorales. Todos los tumores presentan regiones de invasión a los tejidos adyacentes, como por ejemplo invasión muscular (e,g), invasión perineural (f,h), e invasión adiposa (h) (flechas rojas).

Por otra parte, evaluamos la capacidad de las células inoculadas de metastatizar en pulmón para cada una de las variantes resistentes. Observamos pequeños y medianos focos

metastásicos en la mayoría de los pulmones analizados, de entre 2 y 40 células aproximadamente. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la cantidad y tamaño de los focos en las líneas resistentes con respecto a la línea T47D-*wt*. Este análisis fue realizado luego de distintos tiempos de inoculación de las células, desde 1,5 a 3 meses, mediante experimentos independientes. En ninguno de los casos encontramos diferencias significativas entre las variantes. A modo de ejemplo en el panel inferior de la Figura 22 se pueden observar pequeños focos de células tumorales en pulmón. En el caso de la variante doble resistente T47D-TPR, si bien no encontramos focos propiamente dichos, se observa la presencia de embolias vasculares en pulmón (flechas rojas).

Resta analizar el comportamiento invasivo y metastásico de la línea MCF-7 *in vivo*, donde vimos mayor capacidad migratoria en las variantes MCF-7-TR y MCF-7-PR.

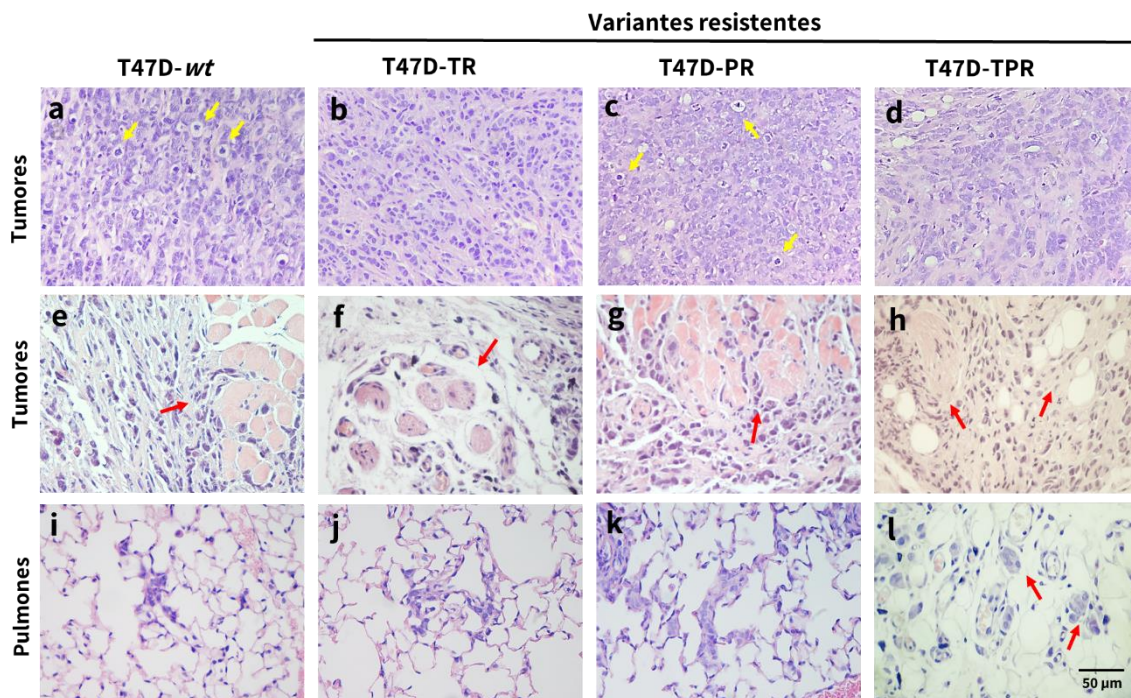


Figura 22. Análisis histológico de tumores y pulmones. Se realizó tinción con hematoxilina-eosina en cortes de los tumores y pulmones correspondientes a los ratones inoculados con las líneas *wild type* y resistentes. Se muestran mitosis con flechas amarillas (a,c). Todos los tumores presentan atipia y pleomorfismo celular (a-d) y zonas de invasión en tejidos adyacentes (flechas rojas): invasión muscular (e,g), invasión perineural (f,h) invasión adiposa (h). Panel inferior (i-l): Focos metastásicos en los pulmones de los ratones inoculados con T47D-*wt* o las variantes resistentes. Se observan embolias vasculares en los pulmones de ratones inoculados con T47D-TPR (flechas rojas).

En las secciones 1-4 vimos que:

- ✓ Las líneas resistentes muestran alteraciones en su morfología creciendo en 2D y 3D, así como también una menor expresión o localización aberrante de E-cadherina. Además, la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presenta un aumento en la proporción de células madre tumorales.
- ✓ La línea resistente a tamoxifeno T47D-TR responde a la inhibición cruzada con palbociclib, así como la resistente a palbociclib T47D-PR responde a la inhibición cruzada con tamoxifeno, en ambos casos en menor medida que la línea parental.
- ✓ Ambas líneas mantienen su resistencia a los respectivos inhibidores *in vivo*.
- ✓ Las variantes MCF-7-TR y MCF-7-PR mostraron mayor capacidad migratoria *in vitro*. Sin embargo, no observamos mayor capacidad invasiva de tejidos adyacentes al tumor ni mayor capacidad metastásica en las variantes T47D con respecto a la T47D-*wt*.
- ✓ Las variantes doble resistentes T47D-TPR y MCF-7-TPR si bien presentan una morfología aberrante en 2D y 3D, no muestran un aumento en la capacidad tumorigénica, metastásica, o en las características *stem* con respecto a la línea parental.

5) Evaluación de la expresión de receptores hormonales y proteínas del ciclo celular.

Analizamos la expresión de los receptores hormonales de estrógenos (ER), progesterona (PR) y andrógenos (AR) en las variantes resistentes, este último debido a su vinculación con la resistencia a tamoxifeno según bibliografía (De Amicis et al. 2010).

En la Figura 23.A se puede observar que todas las variantes T47D resistentes presentan una menor expresión del ER con respecto a la línea T47D-*wt*. En particular, es interesante resaltar que la variante resistente a palbociclib T47D-PR, a pesar de haber sido seleccionada con un inhibidor que no actúa a nivel hormonal, también presenta menor expresión del ER, lo cual se correlacionaría con su menor sensibilidad a inhibidores hormonales, como mostramos anteriormente en este trabajo (Figura 19.A). De igual manera, la expresión del PR se encuentra disminuida drásticamente en las variantes resistentes a tamoxifeno T47D-TR y T47D-TPR y en menor medida en la variante resistente a palbociclib T47D-PR, lo cual podría deberse a la falta de estimulación del ER sobre la expresión del PR, ya reportado previamente (Graham et al. 1997, Petz et al. 2004). Por último, cuando evaluamos la expresión del AR vimos que la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presenta una mayor expresión del mismo. Algunos trabajos han reportado que los

carcinomas de mama ER-/AR+ tienen un peor pronóstico clínico (Cochrane et al. 2014). Aún desconocemos si hay alguna relación causal entre el menor nivel de ER y la mayor expresión del AR en esta variante, pero es similar a resultados preliminares observados por la Lic. Virginia Figueroa y la Dra. Caroline Lamb del IBYME en otro modelo de resistencia endócrina. Esta posible regulación inversa entre el ER y el AR está siendo analizada en particular en las líneas T47D y MCF-7 resistentes que generamos en esta tesis por el grupo de la Dra. Lamb.

Tendencias similares (menor ER, menor PR, mayor AR) se observan en las variantes resistentes MCF-7-TR y MCF-7-PR (Figura 23.B). Restaría evaluar la expresión de los receptores hormonales en la variante MCF-7-TPR.

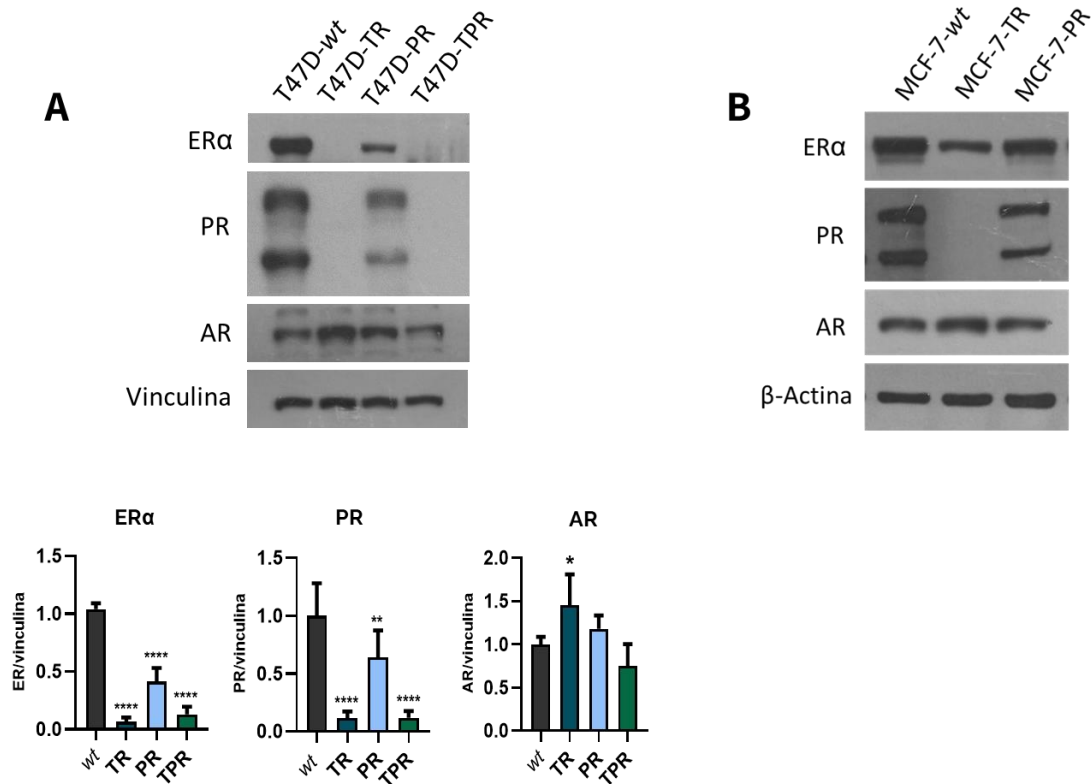


Figura 23. Expresión de receptores hormonales en las líneas T47D y MCF-7. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales en condiciones basales (sin inhibidores de selección). A) Todas las variantes T47D resistentes expresan menos ER y PR, mientras que la variante T47D-TR muestra mayor expresión de AR. Se muestra la cuantificación de como mínimo triplicados independientes. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y relativizadas a vinculina como control de carga. B) Las variantes MCF-7 muestran una tendencia similar a la observada en las variantes T47D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Por otra parte, como habíamos visto que las variantes T47D resistentes se dividen a una menor tasa que la línea parental, decidimos realizar un análisis de fases de ciclo celular mediante citometría de flujo, para determinar si las células se encontraban detenidas en alguna fase del ciclo celular en particular. Observamos que únicamente la variante resistente a palbociclib T47D-PR presenta una mayor proporción de células en fase G2-M en comparación con la línea *wild type*, en simultáneo con una disminución en la proporción de células en G0-G1. No observamos diferencias en las otras variantes resistentes (Figura 24.A). Dado que la medición de ciclo celular por citometría no permite diferenciar las células que se encuentran en G2 de las que se encuentran en mitosis, decidimos evaluar si estas células presentaban aberraciones en las mitosis, provocando que no logren dividirse correctamente. Mediante inmunofluorescencia con DAPI visualizamos las mitosis en esta variante (Figura 24.B). Si bien encontramos algunas células con alteraciones, como la presencia de mitosis tripolar o células gigantes con núcleos irregulares (flechas amarillas), la mayoría de las mitosis observadas son normales. Las fases del ciclo celular a su vez se encuentran asociadas a la expresión diferencial de distintas ciclinas y CDKs a lo largo del ciclo (Figura 24.C), es por eso que a continuación analizamos por western blot la expresión de distintas proteínas de ciclo celular en las líneas celulares, tanto en T47D como en MCF-7.

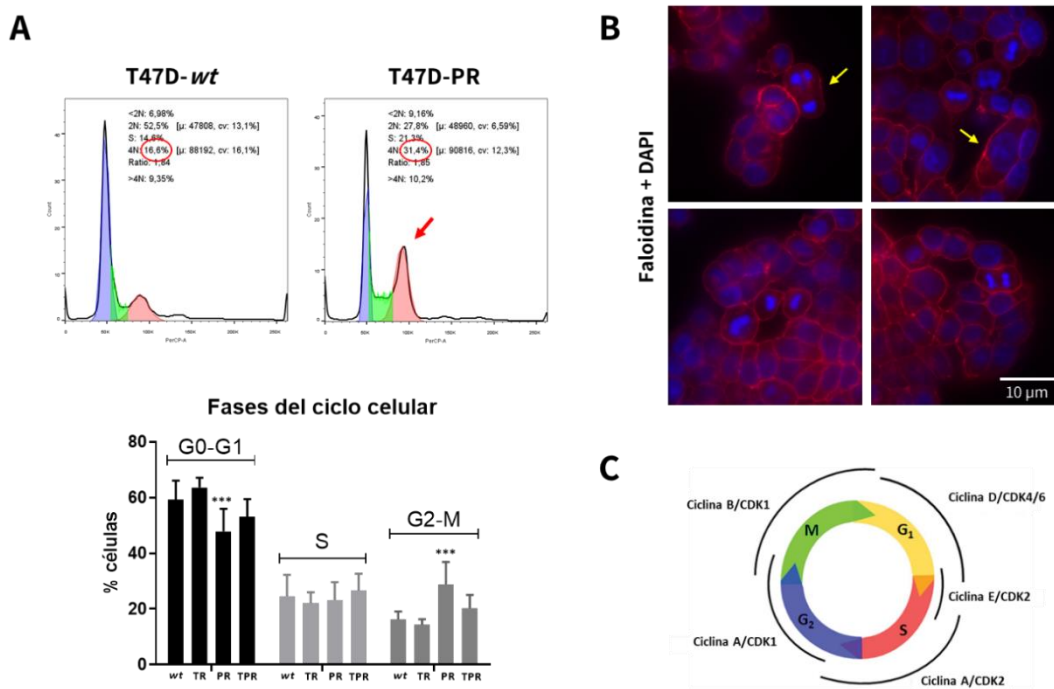


Figura 24. Análisis de fases de ciclo celular. A) Las células fueron teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. La variante T47D-PR presenta mayor proporción de células en fase G2-M. B) Imágenes de microscopía confocal. Se realizó inmunofluorescencia en la variante T47D-PR. Se marcó F-actina con faloidina (rojo) y los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). La

mayoría de las mitosis son normales. Se observa célula con mitosis tripolar y célula gigante con núcleo irregular (flechas amarillas). C) Esquema de las fases del ciclo celular y sus ciclinas/CDKs asociadas. *** $p < 0.001$

En comparación con la línea parental, encontramos una menor expresión de la proteína de retinoblastoma Rb en la variante doble resistente T47D-TPR. A su vez, vemos una mayor expresión de ciclina E2 en ambas resistentes a tamoxifeno T47D-TR y T47D-TPR. Por último, observamos un aumento en CDK6 y CDK1 en la variante resistente a palbociclib T47D-PR. No observamos diferencias significativas en la expresión del resto de las proteínas asociadas a ciclo celular analizadas (Figura 25.A). Cuando analizamos algunas de las proteínas de ciclo celular en las variantes MCF-7, encontramos que la variante resistente a palbociclib MCF-7-PR, al igual que en T47D-PR, presenta mayor expresión de CDK6. Además, en este caso también observamos un aumento en ciclina D1 y CDK4 (Figura 25.B). Resta analizar la expresión en la variante doble resistente MCF-7-TPR.

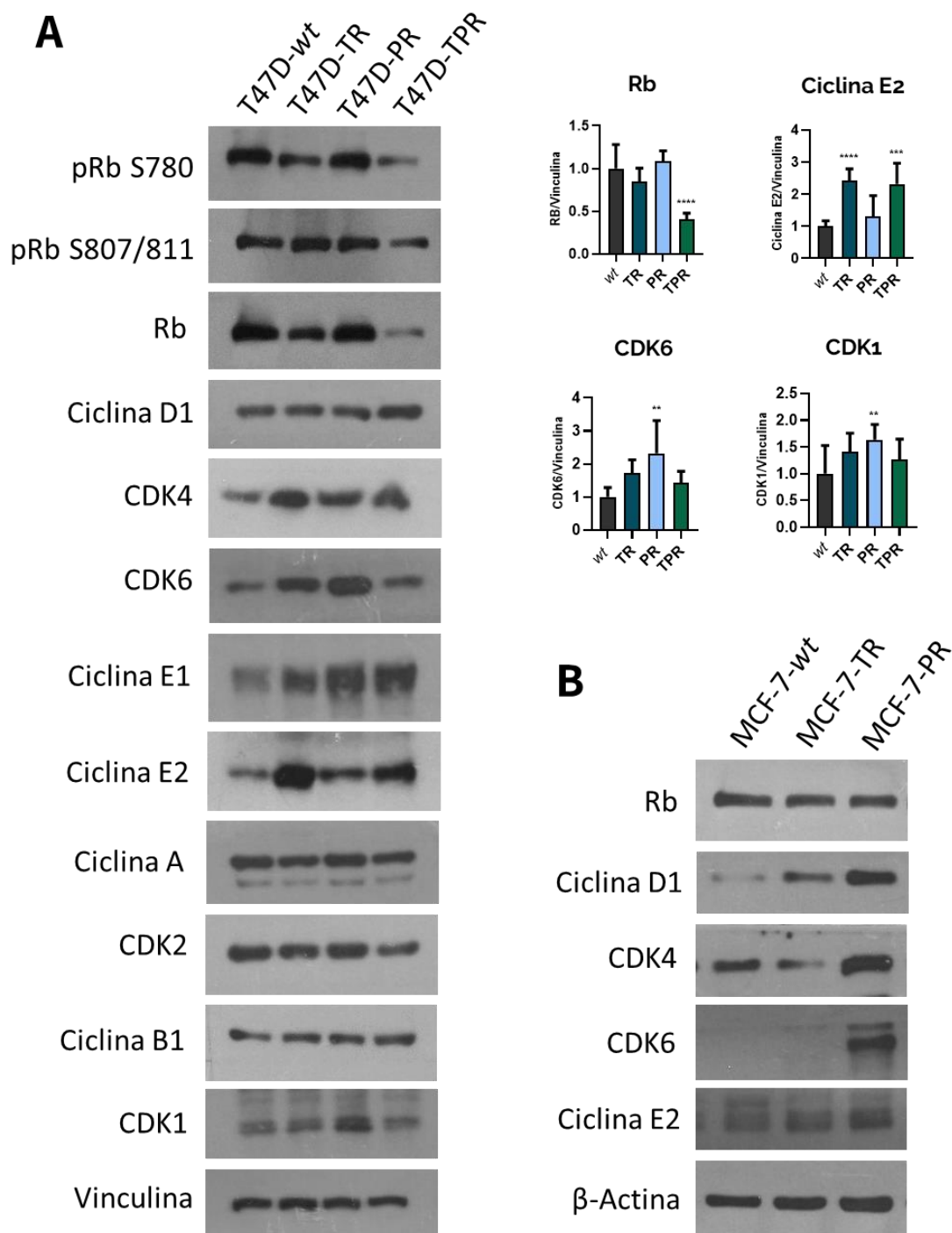


Figura 25. Expresión de proteínas del ciclo celular en las líneas T47D y MCF-7. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales en condiciones basales (sin inhibidores de selección). A) La variante T47D-TPR presenta menor expresión de Rb, las variantes T47D-TR y T47D-TPR presentan mayor expresión de ciclina E2, mientras que la variante T47D-PR muestra mayor expresión en CDK6 y CDK1. A la derecha se muestra la cuantificación de al menos triplicados independientes. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y relativizadas a vinculina como control de carga.

B) La variante MCF-7-PR presenta mayor expresión de ciclina D1, CDK4 y CDK6. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6) Evaluación de la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.

Continuamos la caracterización de las variantes resistentes analizando el estado de activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR, debido a su asociación con resistencia a inhibidores hormonales y de CDK4/6, como ya fue mencionado en la Introducción. Analizamos también la activación de ERK y la expresión de PKC isoforma α , proteínas también asociadas a resistencia hormonal según bibliografía (Lin et al. 2006, Li et al. 2012). Para esto, realizamos extractos proteicos totales de las células en condiciones basales (sin inhibidores de selección) y los analizamos mediante western blot.

Cabe destacar que tanto la línea celular T47D como la línea MCF-7 presentan mutaciones activantes de esta vía en el gen de *PIK3CA*, el cual codifica para la subunidad catalítica α de PI3K (Hollestelle et al. 2007). T47D presenta la mutación H1047R y MCF-7 la mutación E545K, dos de las mutaciones activantes más comunes encontradas en *PIK3CA* en cáncer de mama. Esto implica que ya en condiciones basales y en ausencia de suero, en estas líneas la vía de PI3K/AKT/mTOR se encuentra activa.

Comenzamos analizando distintas proteínas de la vía de PI3K/AKT/mTOR en las variantes T47D (Figura 26.A). No encontramos diferencias significativas en la expresión de PI3K ni en la activación de PTEN en las variantes resistentes con respecto a la línea parental. Por otra parte, observamos mayor fosforilación de AKT (Ser473 y Thr308) en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR y de la proteína ribosomal S6 (Ser240/244 y Ser235/236) en la variante resistente a palbociclib T47D-PR. Llamativamente, observamos que ambas proteínas de la vía no se sobreactivan simultáneamente como hubiéramos esperado. Esto será analizado en posteriores secciones de este trabajo. Por otra parte, encontramos mayor expresión de PKC α en la variante doble resistente T47D-TPR con respecto a la línea parental. Esta proteína se encuentra a su vez regulada por el complejo mTORC2 (Ikenoue et al. 2008, Singh et al. 2017). Al analizar la fosforilación de ERK, no vimos diferencias significativas en las variantes resistentes con respecto a la *wild type*. Por último, cuando analizamos algunas de estas proteínas en las variantes MCF-7, vimos que si bien no se observa mayor activación de AKT (Ser473) en la variante resistente a tamoxifeno MCF-7-TR, encontramos una mayor fosforilación de S6 (Ser240/244) en la resistente a palbociclib MCF-7-PR. Observamos también una mayor expresión de PKC α en la variante resistente a tamoxifeno MCF-7-TR (Figura 26.B). Resta analizar estas vías de señalización en la variante doble resistente MCF-7-TPR.

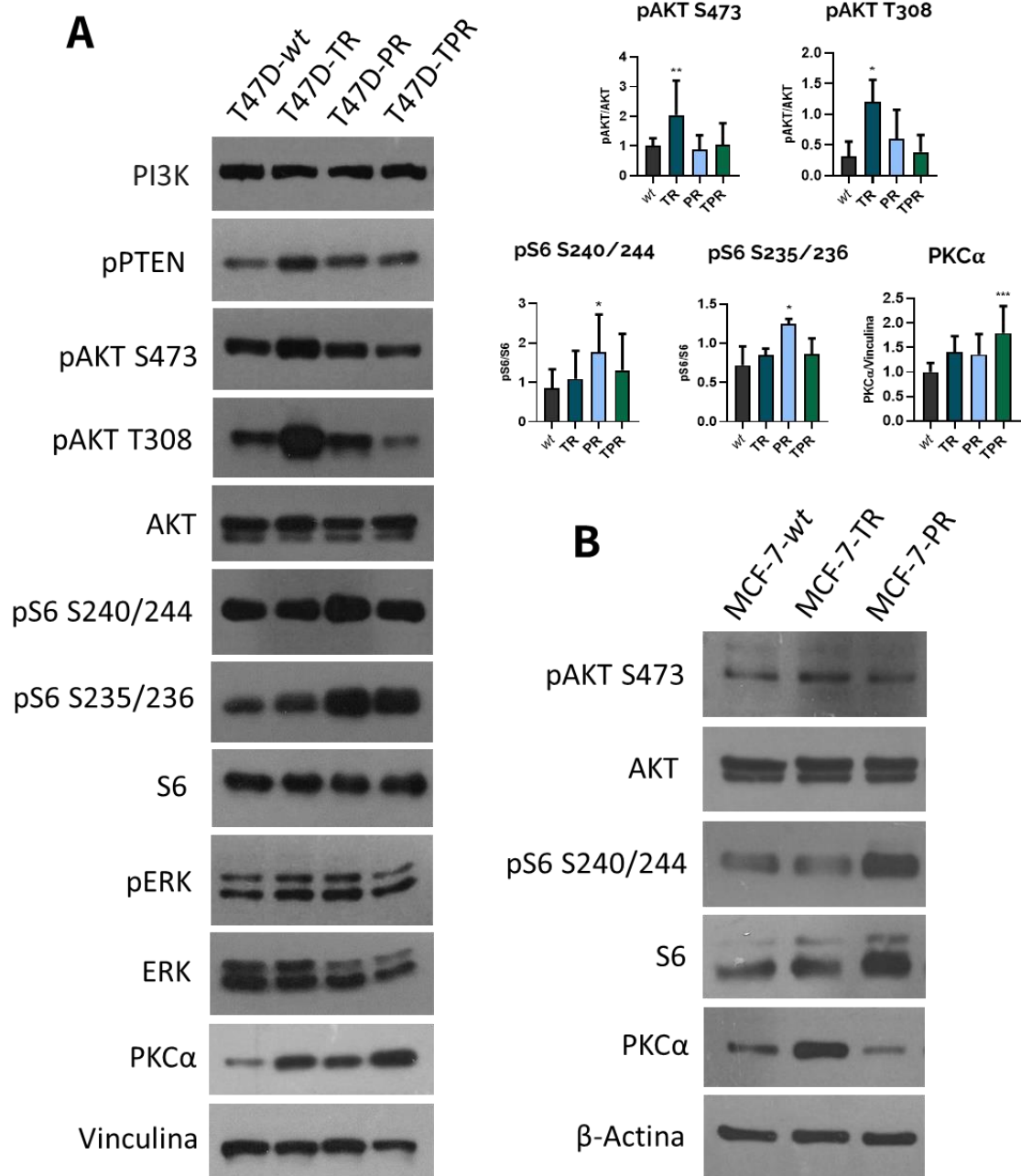


Figura 26. Activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR, ERK y PKC α en las líneas T47D y MCF-7. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales en condiciones basales (sin inhibidores de selección). A) La variante T47D-TR presenta mayor activación de AKT, mientras que la variante T47D-PR muestra mayor activación de S6. La variante T47D-TPR presenta mayor expresión de PKC α . A la derecha se muestra la cuantificación de al menos triplicados independientes. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y relativizadas a vinculina como control de carga. B) La variante MCF-7-TR presenta mayor expresión de PKC α , mientras que la línea MCF-7-PR mostró mayor activación de S6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7) Análisis de nuevas mutaciones adquiridas mediante secuenciación de exoma completo.

A continuación, para poder profundizar en la caracterización de las variantes resistentes decidimos realizar un análisis de secuenciación de exoma completo. Este análisis permite identificar no solo mutaciones en los genes sino también alteraciones en el número de copias, es decir, si existen amplificaciones o deleciones en alguno de ellos. El análisis de los datos obtenidos en la secuenciación todavía está en proceso y los resultados que se muestran a continuación son preliminares. Por el momento sólo analizamos la parte de mutaciones, y se encuentra en curso el análisis del número de copias. El análisis bioinformático de los datos de la secuenciación fue realizado en colaboración con la Lic. Valeria Salinas (Hospital Ramos Mejía) y el Bioquímico Andrés Elia (Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, IBYME). Las mutaciones fueron filtradas por patogenicidad utilizando en paralelo los predictores REVEL, SIFT, Polyphen2 y CLNSIG según se explica en (https://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/protein_function.html).

En el diagrama de Venn de la Figura 27.A. se puede ver que todas las líneas comparten un total de 1080 mutaciones patogénicas, algunas de las cuales pueden corresponder a un mismo gen. Observamos también que cada variante presenta mutaciones particulares no presentes en las otras variantes, y algunas mutaciones son compartidas entre las distintas líneas. A modo de ejemplo, en la Figura 27.B podemos ver una tabla donde se enumeran algunos de los genes que presentan una o más mutaciones patogénicas en cada variante, pero que no se encuentran presentes en la línea original *wild type*, es decir, fueron adquiridas durante el proceso de selección. Vemos que algunos de esos genes se asocian a procesos de adhesión celular y matriz extracelular (marcados en rojo), otros se asocian a *stemness* y transición epitelio-mesenquimal (en negro) y por último algunos se asocian a la regulación del ciclo celular (en azul). En particular, encontramos una mutación patogénica en el gen *TUBG1*, que codifica para la proteína γ -tubulina, involucrada en la transición de fase G2-M del ciclo celular en la variante resistente a palbociclib T47D-PR. Sería interesante evaluar si esta mutación pudiera estar asociada a la mayor proporción de células en fase G2-M que encontramos en esta variante.

Por último, mediante este análisis no detectamos nuevas mutaciones en el gen de *PIK3CA* ni en otros intermediarios importantes de la vía de PI3K/AKT/mTOR que puedan explicar el aumento en pAKT o pS6 observado en las variantes resistentes, por lo cual creemos que esta sobreactivación podría provenir de otras vías de señalización que interactúen con la vía de PI3K/AKT/mTOR, u otro tipo de modificación ya sea epigenética, post-transcripcional u otra. Tampoco encontramos nuevas mutaciones en los genes codificantes para CDKs, ciclina D1, ciclina E y receptores hormonales. Resta evaluar si los cambios observados en los niveles proteicos observados en la Figura 23 y Figura 25 se asocian a variación en el número de copias de estos genes o a otros procesos.

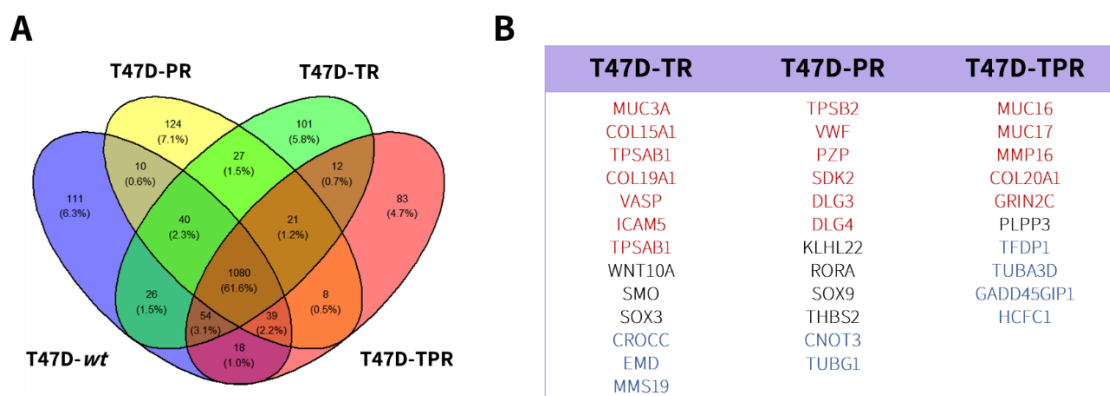


Figura 27. Análisis de mutaciones patogénicas presentes en la línea T47D-*wt* y variantes resistentes. A) Diagrama de Venn representando la cantidad de mutaciones patogénicas en común y en particular en cada una de las variantes. B) Tabla con algunos de los genes mutados en las variantes resistentes que no presentan esa mutación en la línea *wild type*. Las variantes resistentes adquirieron mutaciones en genes asociados a adhesión y matriz extracelular (rojo), *stemness/EMT* (negro) y ciclo celular (azul).

8) Estado de activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y expresión de ER al retirar las drogas de selección.

A continuación, decidimos evaluar qué ocurría al retirar las drogas de selección con las cuales son mantenidas las variantes resistentes en cultivo, para verificar si la disminución en la expresión del ER es un proceso estable o se encuentra inducido por la presencia constante de la droga en el medio de cultivo. En la Figura 28.A se puede observar que luego de 13 o 18 días en ausencia de tamoxifeno y/o palbociclib, las variantes resistentes no recuperan la expresión de ER a los niveles de la línea T47D-*wt*.

Además, decidimos analizar la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR para evaluar si el aumento en pAKT o en pS6 observado a nivel basal en las líneas T47D-TR y T47D-PR (Figura 26.A) podría deberse a un efecto directo de la presencia constante de tamoxifeno o palbociclib en el medio de cultivo. Debido a cuestiones experimentales no pudimos comparar en este ensayo las variantes resistentes con respecto a la línea *wild type*, como fue mostrado en la Figura 26.A. Comparamos entonces los niveles de pAKT y pS6 de las variantes resistentes 24 horas luego de retirar la droga (como hacemos normalmente para evaluar la activación basal) con los niveles luego de 13 y 18 días sin las drogas de selección. Observamos que al retirar el tamoxifeno en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR los niveles de pAKT y pS6 no disminuyen con respecto al nivel de activación basal de esta línea. En el caso de las variantes T47D-PR y T47D-TPR observamos que, si bien a los 13 días

pareciera disminuir pS6, a los 18 días vemos que los niveles de activación de pS6 son similares a los niveles de activación basal de cada línea (Figura 28.B). Estos resultados nos indicarían que los efectos observados en las variantes resistentes sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y ER se mantienen estables incluso luego de retirar las drogas del medio de cultivo, es decir, estas modificaciones no serían reversibles al menos en los plazos evaluados. Restaría además evaluar la sensibilidad a los inhibidores con los cuales fueron seleccionadas las variantes luego de la interrupción en la administración de las mismas.

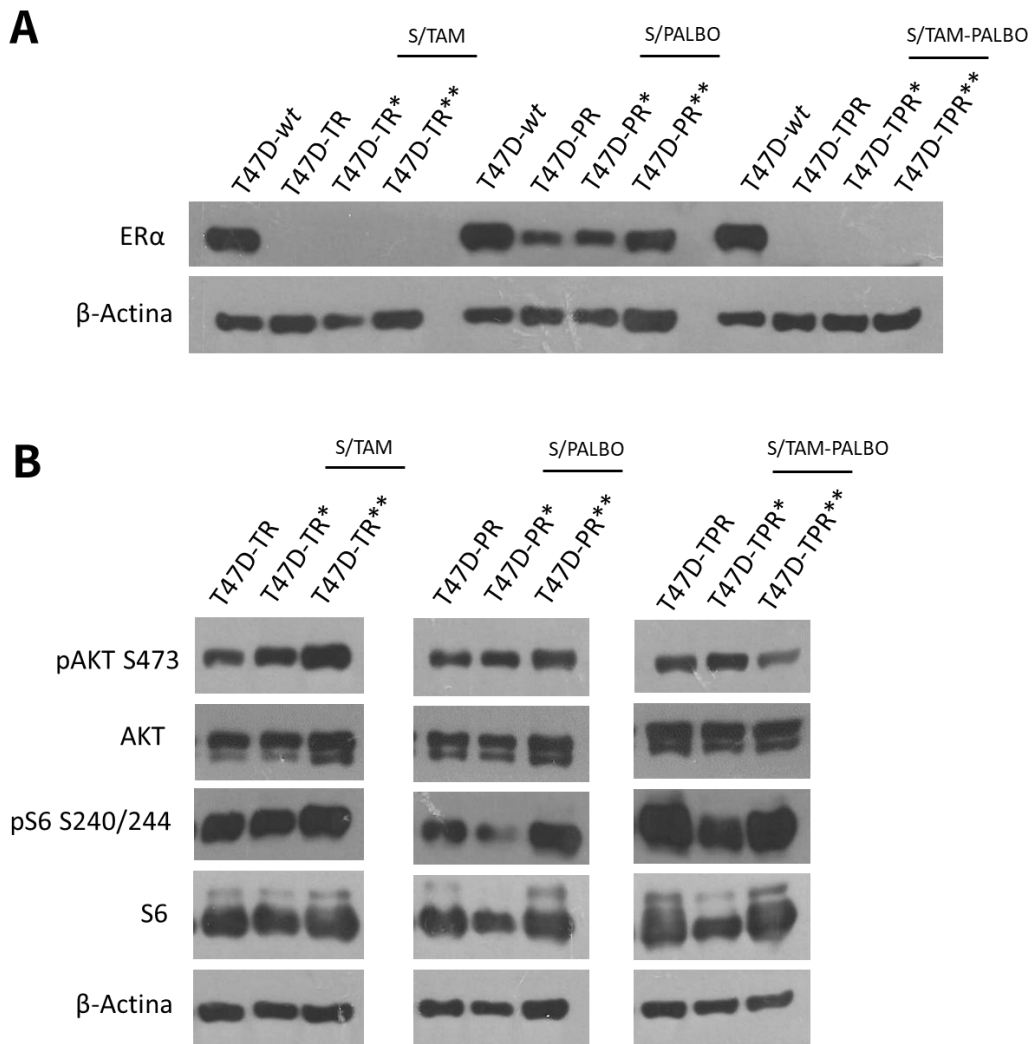


Figura 28. Expresión de ER y activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR al retirar las drogas de selección en las variantes T47D resistentes. Se realizaron extractos proteicos totales de las variantes resistentes luego de cultivarlas durante 24 horas, 13 días (*) o 18 días (**) en ausencia de los inhibidores de selección. A) Las variantes resistentes no recuperan la expresión de ER a los niveles de la línea *wild type* luego de 13 o 18 días en ausencia de los inhibidores. B) La activación de AKT y de S6 no disminuye al nivel basal de cada línea al retirar las drogas de selección por 18 días.

En las secciones 5-8 vimos qué:

- ✓ Todas las variantes resistentes presentan menor expresión de ER y PR. Además, las variantes resistentes a tamoxifeno T47D-TR y MCF-7-TR muestran un aumento en AR.
- ✓ La variante resistente a palbociclib T47D-PR presenta un aumento en la proporción de células en G2-M.
- ✓ Las variantes resistentes muestran desregulación en varias proteínas del ciclo celular, como disminución de Rb, aumento de ciclina D1, ciclina E2, CDK4, CDK6 y CDK1.
- ✓ Las variantes resistentes presentan un aumento en la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de pAKT (T47D-TR) o de pS6 (T47D-PR y MCF-7-PR). A su vez, vemos un aumento en PKC α en las variantes T47D-TPR y MCF-7-TR.
- ✓ Las variantes resistentes adquirieron nuevas mutaciones patogénicas en genes asociados a adhesión celular, *stemness/EMT* y ciclo celular, entre otros. Sin embargo, no presentaron nuevas mutaciones en la vía de PI3K/AKT/mTOR, ni en genes codificantes para CDKs, ciclina D1, ciclina E ni receptores hormonales.
- ✓ Al retirar las drogas de selección, las variantes resistentes no recuperan la expresión de ER a los niveles de la línea T47D-*wt*, así como tampoco se modifica la fosforilación de AKT o S6 con respecto al estado basal de activación en estas variantes. Es decir, estas alteraciones no serían reversibles, aunque se interrumpa la administración de la droga.

SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LAS VARIANTES RESISTENTES A INHIBIDORES DE PI3K/AKT/mTOR Y DE CDK4/6.

9) Comparación de la sensibilidad a inhibidores que actúan a distintos niveles de la vía PI3K/AKT/mTOR.

A continuación, como habíamos observado que las variantes resistentes a tamoxifeno y a palbociclib presentaban mayor activación de AKT o de S6 pero no necesariamente de ambas proteínas en simultáneo, decidimos comparar el efecto de distintos inhibidores de PI3K/AKT/mTOR que actúan a distintos niveles de la vía. Realizamos para esto ensayos

de proliferación celular por conteo de células a tiempo final en las líneas T47D. Evaluamos dosis crecientes de los inhibidores, y comparamos la respuesta de las variantes resistentes con respecto a la línea T47D-*wt*, para cada inhibidor y no entre inhibidores diferentes. Los inhibidores utilizados fueron alpelisib (inhibidor de PI3K específico de isoforma α), MK-2206 (inhibidor de AKT), rapamicina/everolimus (inhibidores de mTORC1) y AZD2014 (inhibidor mTORC1/2) (Figura 29).

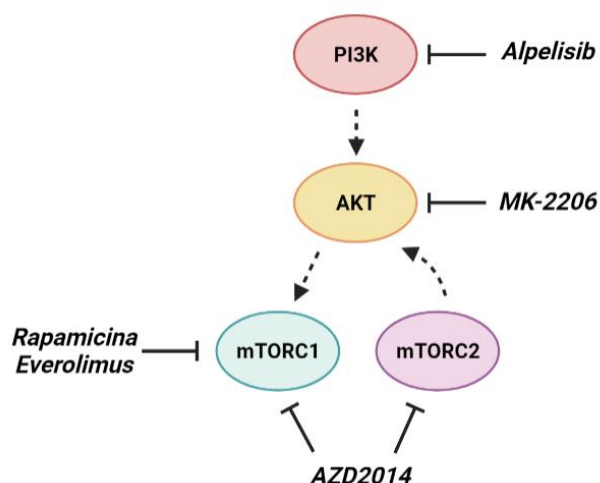


Figura 29. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR utilizados.

Observamos que todos los agentes son capaces de inhibir la proliferación de las líneas celulares. Como mencionamos anteriormente, la línea T47D presenta una mutación activante (H1047R) en el gen *PIK3CA*, lo cual podría sensibilizar a esta línea al uso de cualquiera de los inhibidores de la vía.

En la Figura 30 se pueden ver las curvas de proliferación para cada variante luego del tratamiento con dosis crecientes de alpelisib (inhibidor PI3K isoforma α) y MK-2206 (inhibidor de AKT). En el caso de alpelisib, podemos ver que la variante resistente a palbociclib T47D-PR responde menos que la línea T47D-*wt* a varias dosis del mismo. A modo de ejemplo, en el gráfico de barras se puede ver que con una dosis de 0,5 μ M, la variante resistente se inhibe un 60% menos que la línea parental. Cuando evaluamos el efecto de inhibir AKT utilizando MK-2206, encontramos que, por el contrario, la variante T47D-PR se inhibe más que la línea *wild type*. La variante resistente a tamoxifeno T47D-TR también presentó mayor inhibición con MK-2206 en la mayoría de las dosis evaluadas, lo cual se podría correlacionar con el aumento en la activación de AKT en esta línea (Figura 26.A), haciéndola más sensible a la inhibición de esta proteína. Como ejemplo se puede observar en el gráfico de barras que, con una dosis de 0,1 μ M de MK-2206, la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR inhibe su proliferación un 50% más que la línea parental.

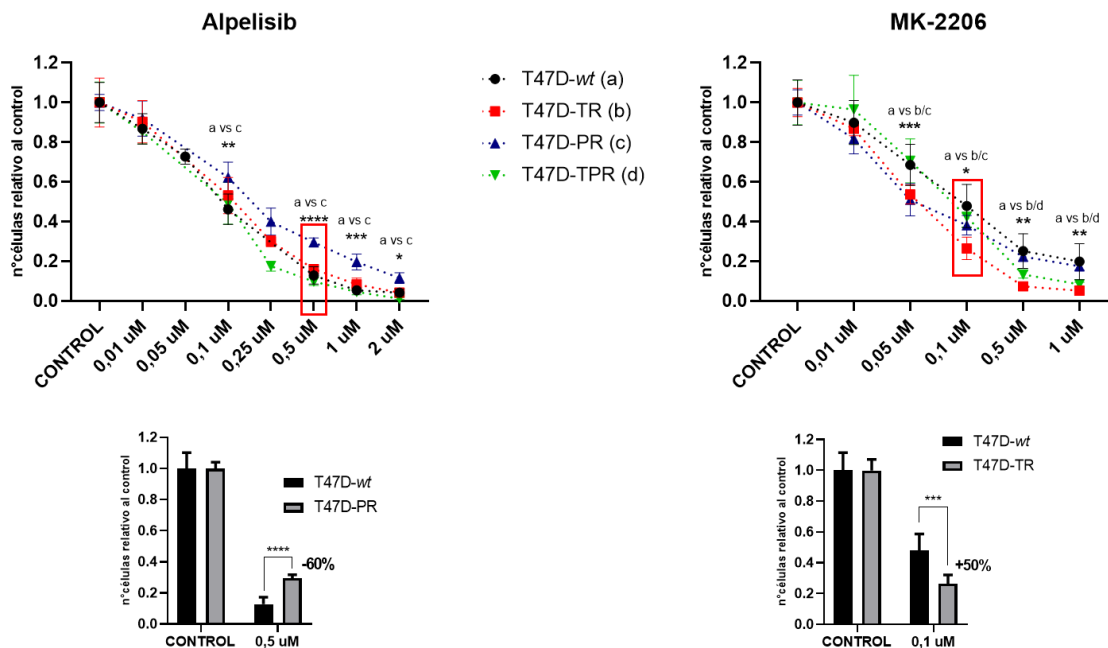


Figura 30. Efecto de alpelisib y MK-2206 sobre la proliferación celular de las variantes T47D. Realizamos ensayos de proliferación por conteo de células final. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de alpelisib (inhibidor PI3K α) o MK-2206 (inhibidor AKT) por 7 días. La variante T47D-PR responde menos a alpelisib, mientras que la variante T47D-TR responde más a MK-2206 que la línea parental. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

A continuación, evaluamos la sensibilidad de las líneas a inhibidores de mTOR. Utilizamos rapamicina y everolimus (inhibidores mTORC1) y AZD2014 (inhibidor mTORC1/mTORC2). Observamos una mayor inhibición con rapamicina en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR, y más aún en la resistente a palbociclib T47D-PR, en comparación con la línea T47D-*wt*, como se puede observar a dosis de 0,01 uM, donde la proliferación se inhibe un 40% más que en la línea parental (Figura 31). Llamativamente, esta diferencia no fue observada al utilizar el inhibidor everolimus, análogo de rapamicina, e incluso en este caso la variante doble resistente T47D-TPR mostró una inhibición menor con respecto a la línea parental. En el caso del inhibidor dual mTORC1/2 AZD2014 observamos que las variantes resistentes a tamoxifeno T47D-TR y a palbociclib T47D-PR se inhiben menos respecto a la línea T47D-*wt* a algunas de las dosis evaluadas. Las diferencias entre everolimus y rapamicina y la importancia de inhibir sólo mTORC1 o ambos complejos en paralelo será discutido más adelante en la sección de Discusión de este trabajo.

Es importante que tengamos en cuenta que, si bien al comparar la respuesta en las distintas variantes encontramos algunas diferencias significativas en la inhibición con respecto a la línea *wild type*, todas las variantes son sensibles a **todos** los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR evaluados, en mayor o menor medida.

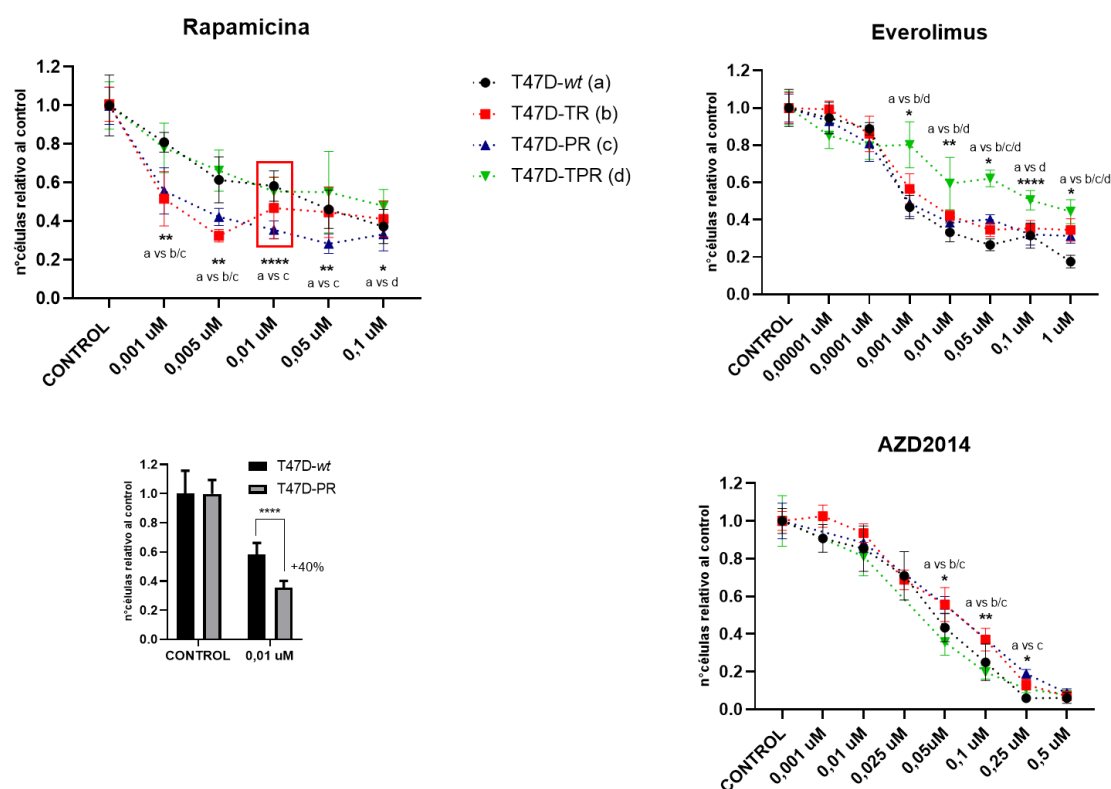


Figura 31. Efecto de rapamicina, everolimus y AZD2014 sobre la proliferación celular de las variantes T47D. Realizamos ensayos de proliferación por conteo de células final. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de rapamicina/everolimus (inhibidores mTORC1) y AZD2014 (inhibidor mTORC1/2) por 7 días. La variante T47D-PR responde más que la *wt* a rapamicina, mientras que la variante T47D-TPR responde menos a everolimus. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

10) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib.

Como comentamos en la Introducción, por el momento tanto los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR aprobados para su uso en la clínica (alpelisib y everolimus) como los inhibidores de CDK4/6 (palbociclib, ribociclib y abemaciclib) son utilizados en combinación con terapia hormonal y no como monoterapia. Por otra parte, numerosa evidencia sugiere que los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y los de CDK4/6 podrían actuar de forma sinérgica al ser combinados, inhibiendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral, ya que estas vías interactúan en varios puntos, regulándose mutuamente, como ya comentamos en la Introducción (Figura 5). Decidimos entonces evaluar el efecto de combinar estos inhibidores en las líneas T47D, tanto en cultivo celular

mediante ensayos de proliferación como *in vivo* en ratones. Utilizamos rapamicina como inhibidor de la vía de PI3K/AKT/mTOR, con el cual obtuvimos mejores efectos inhibitorios en el apartado anterior y palbociclib como inhibidor de CDK4/6. Sería interesante evaluar más adelante el efecto de la combinación de alpelisib con palbociclib para poder comparar los resultados.

Como podemos ver en la Figura 32, todas las líneas son sensibles a palbociclib y a rapamicina, y el tratamiento combinado mostró una inhibición significativamente mayor que ambas drogas por separado. La triple combinación tamoxifeno + palbociclib + rapamicina no mostró un efecto mayor que la combinación de palbociclib + rapamicina, tanto en la línea *wild type* como en las resistentes a tamoxifeno T47D-TR y T47D-TPR. Esto podría deberse a que la combinación palbociclib + rapamicina ya es muy efectiva por sí sola, por lo tanto, sería interesante evaluar dosis más bajas de los inhibidores para comprobar que no existe un mayor efecto al adicionar tamoxifeno. Resta evaluar la triple combinación en el caso de la variante resistente a palbociclib T47D-PR.

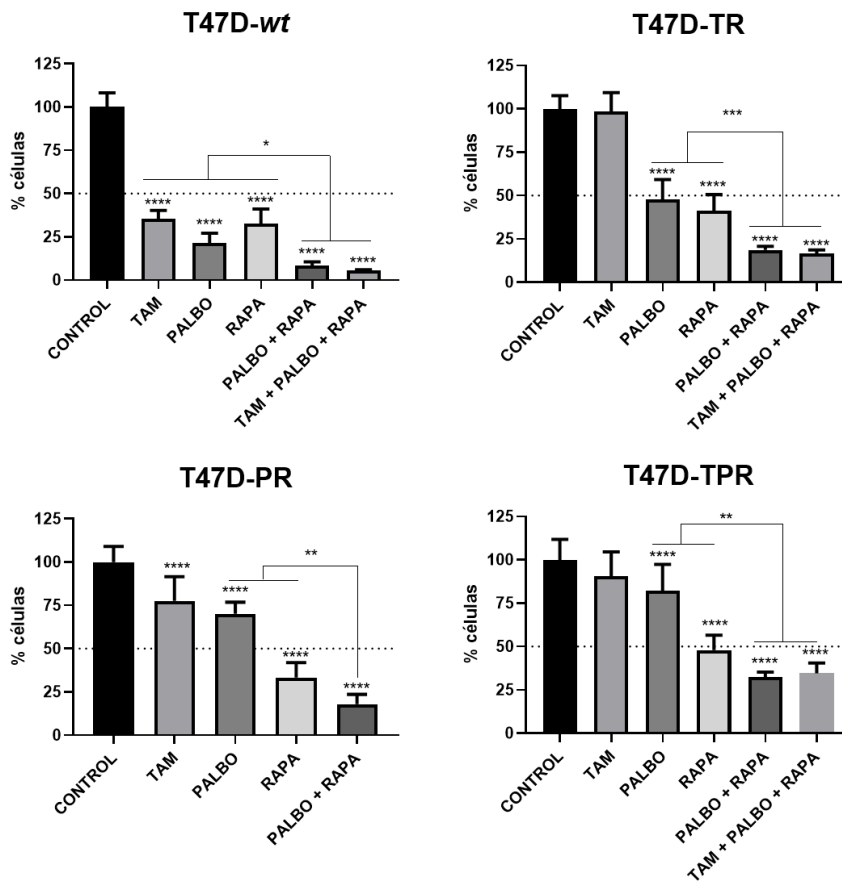


Figura 32. Efecto de la combinación de palbociclib, rapamicina y tamoxifeno sobre la proliferación celular. Realizamos ensayos de proliferación celular por conteo final de células. Las células fueron tratadas con tamoxifeno (TAM) 0,1 uM, rapamicina (RAPA) 0,1 uM, palbociclib (PALBO) 0,1 uM y sus combinaciones por 7 días. Todas las líneas mostraron mayor inhibición de la proliferación al combinar palbociclib con rapamicina. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 ****p<0.0001.

Luego evaluamos la combinación de palbociclib con rapamicina *in vivo* en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR y en la resistente a palbociclib T47D-PR (Figura 33). Como mencionamos anteriormente, la sensibilidad de la variante doble resistente T47D-TPR a los inhibidores no pudo ser evaluada *in vivo* debido a que los tumores que forma son demasiado pequeños. En el caso de los tumores T47D-TR vemos que son sensibles tanto a palbociclib como a rapamicina, y en este caso la combinación mostró una mayor inhibición sobre el crecimiento tumoral, de igual forma que *in vitro*. En el caso de la variante resistente a palbociclib T47D-PR, vemos que responde a rapamicina *in vivo* al igual que *in vitro*. Sin embargo, a diferencia de lo observado en cultivo celular, donde mantiene un nivel de inhibición con palbociclib, esta variante es resistente a palbociclib *in vivo* y la combinación de esta droga con rapamicina no muestra un mayor efecto inhibitorio que rapamicina como monoterapia. Este inhibidor ya muestra una inhibición muy grande del crecimiento tumoral por sí solo con la dosis utilizada, por lo tanto, sería interesante evaluar dosis menores de forma de tener un margen mayor para evaluar la inhibición del tratamiento combinado.

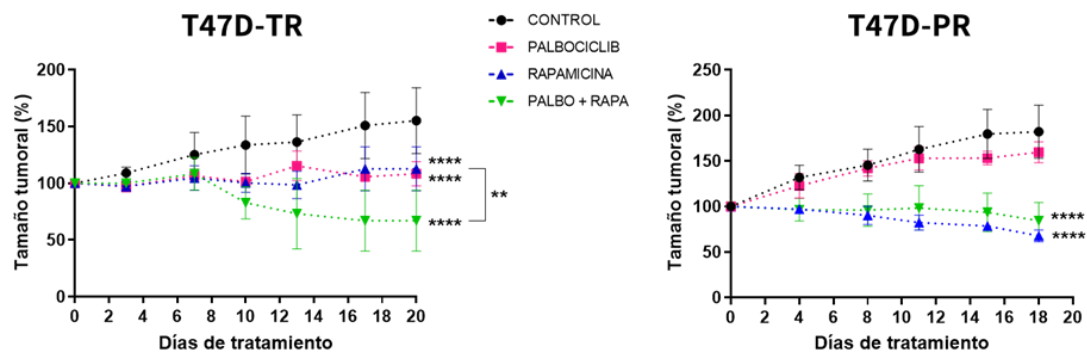


Figura 33. Efecto de la combinación de palbociclib y rapamicina sobre el crecimiento tumoral. Se inocularon 8×10^6 células T47D-TR o T47D-PR de forma subcutánea en el flanco lateral de ratones NSG, 24 horas después de la implantación de pellets de estradiol de 0,25 mg. El tamaño tumoral se relativizó al tamaño inicial al momento de comenzar los tratamientos. Los tumores fueron tratados con palbociclib (25mg/kg s.c. 5 veces por semana), rapamicina (17,5 mg/kg i.p. 2 veces por semana) o la combinación. La variante T47D-TR es sensible a palbociclib y rapamicina *in vivo* y la combinación tiene un efecto significativamente mayor que las drogas individuales. La variante T47D-PR es sensible a rapamicina, pero la combinación con palbociclib no tiene un efecto inhibitorio mayor con respecto a rapamicina sola. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

11) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular.

Como vimos en las secciones anteriores, todos los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR fueron capaces de inhibir la proliferación en las variantes resistentes. Además, la combinación del inhibidor de mTOR rapamicina con palbociclib resultó ser más efectiva que los tratamientos individuales.

Para profundizar en este análisis, decidimos evaluar el efecto de la combinación de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib sobre la activación de esta vía y proteínas del ciclo celular. Evaluamos el efecto de alpelisib (inhibidor PI3K α), MK-2206 (inhibidor AKT), rapamicina/everolimus (inhibidores mTORC1), AZD2014 (inhibidor mTORC1/2 y sus combinaciones con palbociclib, utilizando una única dosis intermedia de las drogas (0,1 uM), siendo esta una dosis que inhibe la proliferación en un porcentaje cercano al 50% en las distintas líneas. Los tratamientos fueron realizados por 30 horas y a continuación se analizaron los extractos proteicos por western blot.

En la Figura 34 podemos observar los tratamientos en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR. En el panel de la izquierda podemos ver que los inhibidores funcionan correctamente inhibiendo sus proteínas blanco. En el caso de alpelisib y MK-2206 vemos que la fosforilación en ambos sitios de AKT disminuye, y en menor medida la fosforilación de S6. Por otro lado, vemos que los inhibidores de mTOR (rapamicina, everolimus y AZD2014) inhiben eficientemente pS6, proteína *downstream*.

Por otra parte, es interesante resaltar que, por lo menos en las condiciones de este ensayo, palbociclib no es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de AKT ni S6 (flechas amarillas). Esto se contrapone con lo esperado según los trabajos mencionados en la Introducción (Zacharek et al. 2005, Romero-Pozuelo et al. 2020), donde se afirma que el complejo ciclina D1/CDK4/6 activo es capaz de activar la vía de PI3K/AKT/mTOR, por lo tanto, la inhibición con palbociclib debería reducir esta activación. Este tema será abordado con más detalle en secciones posteriores de este trabajo.

En el panel de la derecha podemos ver que palbociclib, como era de esperar en esta variante T47D-TR que es sensible al mismo, inhibe la fosforilación de Rb en ambos sitios, además, observamos que produce un aumento en la expresión de ciclina D1 (flechas rojas). La adición de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR al tratamiento con palbociclib acentúa la inhibición de la fosforilación de Rb, y además logra disminuir la expresión de ciclina D1 (principalmente con AZD2014) y la expresión de ciclina A. Sin embargo, no logra disminuir la expresión de ciclina E2, proteína que habíamos visto se encuentra sobreexpresada en esta variante resistente (recuadro rojo). Es interesante resaltar que everolimus y ADZ2014 sólo logran disminuir ciclina E2 cuando se las utiliza como monodrogas, no en combinación con palbociclib, probablemente debido al efecto inductor

que sigue ejerciendo este agente. Por último, podemos ver que AZD2014 es capaz de inhibir pRb incluso como monodroga.

T47D-TR

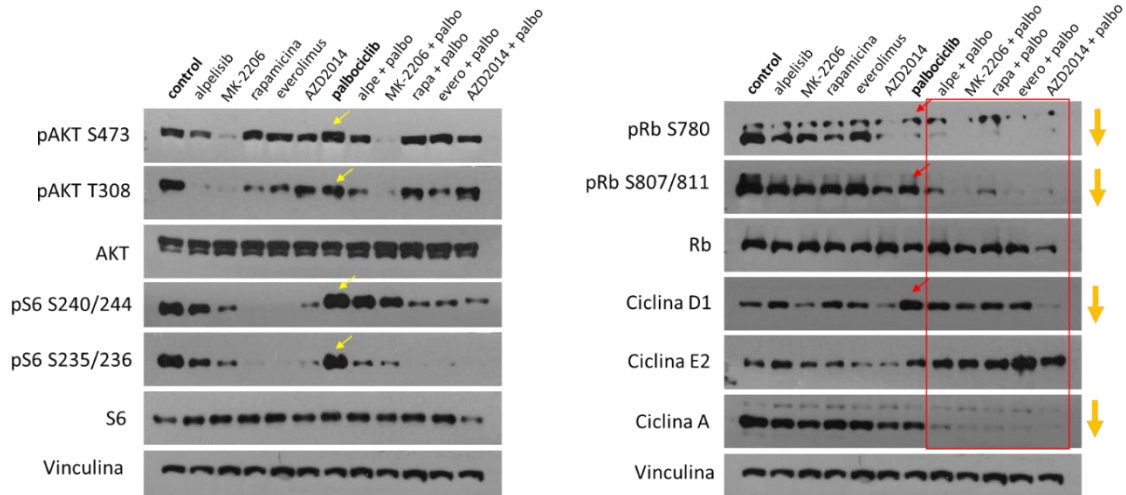


Figura 34. Efecto de los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía y sobre proteínas del ciclo celular en la variante T47D-TR. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con alpelisib, MK-2206, rapamicina, everolimus, AZD2014, palbociclib y sus combinaciones, en concentración 0,1 uM. Palbociclib no inhibe la fosforilación de AKT ni S6 (panel izquierdo, flechas amarillas), mientras que sí disminuye pRb y aumenta ciclina D1 (panel derecho, flechas rojas). La combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR disminuye pRb, ciclina D1 y ciclina A (cuadro rojo).

En la Figura 35 podemos observar los tratamientos en la variante resistente a palbociclib T47D-PR. En el panel de la izquierda nuevamente podemos verificar que los inhibidores funcionan correctamente inhibiendo sus proteínas blanco. En el caso de alpelisib vemos que no logra inhibir eficientemente pS6 en ambos sitios de fosforilación, esto podría correlacionarse con la menor respuesta proliferativa de esta variante al alpelisib, y al aumento en pS6 descrito en secciones anteriores (Figura 30 y 26.A). Por otra parte, nuevamente vemos que palbociclib no es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de AKT ni S6 (flechas amarillas). En el panel de la derecha podemos ver que palbociclib no logra inhibir la fosforilación de Rb y al igual que en la variante T47D-TR, produce un aumento en ciclina D1 (flechas rojas). Sin embargo, vemos que la combinación de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib logra disminuir la fosforilación de Rb en ambos sitios, disminuye la expresión de ciclina E2 y en menor medida de ciclina A y ciclina D1, principalmente con la utilización de AZD2014 (recuadro rojo). Además, nuevamente vemos que AZD2014 es capaz de inhibir pRb incluso como monodroga.

T47D-PR

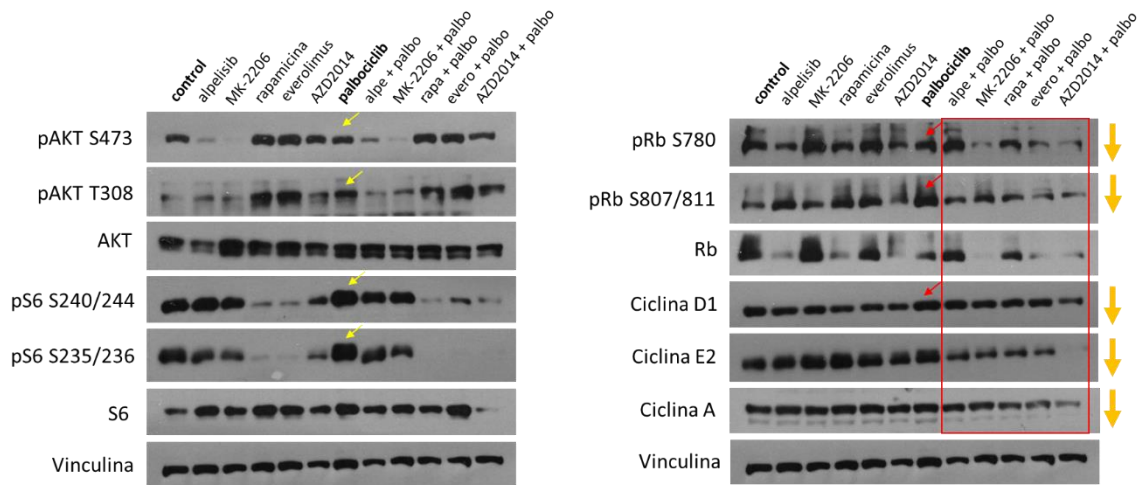


Figura 35. Efecto de los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía y sobre proteínas del ciclo celular en la variante T47D-PR. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con alpelisib, MK-2206, rapamicina, everolimus, AZD2014, palbociclib y sus combinaciones, en concentración 0,1 μ M. Palbociclib no inhibe la fosforilación de AKT ni S6 (panel izquierdo, flechas amarillas), así como tampoco logra inhibir pRb. Además, produce un aumento en ciclina D1 (panel derecho, flechas rojas). La combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR disminuye pRb, ciclina D1, ciclina E2 y ciclina A (cuadro rojo).

Finalmente, en la Figura 36 podemos observar los tratamientos en la variante doble resistente T47D-TPR. En el panel de la izquierda nuevamente podemos verificar que los inhibidores funcionan correctamente inhibiendo sus proteínas blanco. Nuevamente vemos que palbociclib no es capaz de inhibir la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de AKT ni S6 (flechas amarillas). En el panel de la derecha podemos ver que palbociclib tampoco logra inhibir la fosforilación de Rb en esta variante (flechas rojas). Sin embargo, vemos que los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR en combinación con palbociclib logran disminuir la fosforilación de Rb en ambos sitios, siendo rapamicina la que menos efecto ejerce en este caso. Por último, observamos que principalmente la combinación de palbociclib con MK-2206 o AZD2014 disminuye la expresión de ciclina D1, ciclina E2 y ciclina A (recuadro rojo). En este caso también observamos que AZD2014 es capaz de inhibir pRb incluso como monodroga.

T47D-TPR

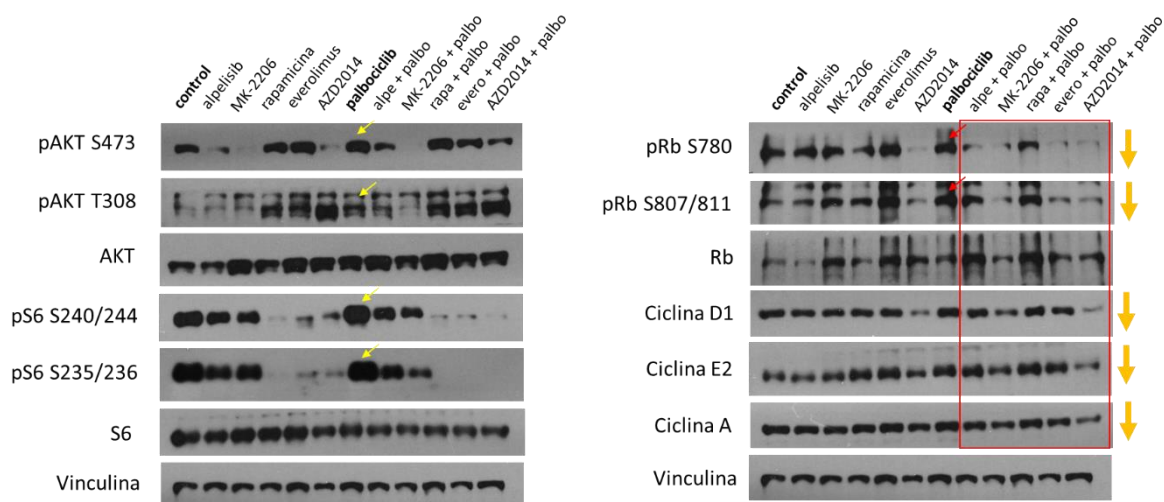


Figura 36. Efecto de los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y palbociclib sobre la vía y sobre proteínas del ciclo celular en la variante T47D-TPR. Se realizaron western blots de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con alpelisib, MK-2206, rapamicina, everolimus, AZD2014, palbociclib y sus combinaciones, en concentración 0,1 μ M. Palbociclib no inhibe la activación de AKT ni S6 (panel izquierdo, flechas amarillas), así como tampoco logra inhibir pRb (panel derecho, flechas rojas). La combinación de palbociclib con MK-2206 o AZD2014 disminuye pRb, y ciclina D1, ciclina E2 y ciclina A (cuadro rojo).

Finalmente, decidimos analizar mediante inmunohistoquímica los tejidos provenientes de tumores T47D-TR y T47D-PR tratados con rapamicina, palbociclib y la combinación, para comparar con los resultados a tiempos cortos obtenidos *in vitro*. Los tratamientos en ratones fueron de aproximadamente tres semanas.

Realizamos inmunohistoquímica para pRb (como marcador de activación del ciclo celular) y pS6 (como marcador de activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR). En la Figura 37 podemos observar los tejidos de los tumores resistentes a tamoxifeno T47D-TR luego de los distintos tratamientos. Vemos que la presencia de células positivas para pRb disminuye tanto con palbociclib como con rapamicina, mientras que el tratamiento combinado la reduce casi por completo. Por otro lado, cuando analizamos la presencia de células positivas para pS6 vemos que, si bien en este caso el tratamiento con palbociclib sí logra reducirla en cierta medida, sólo el tratamiento con rapamicina y el doble tratamiento son capaces de eliminarla por completo.

T47D-TR

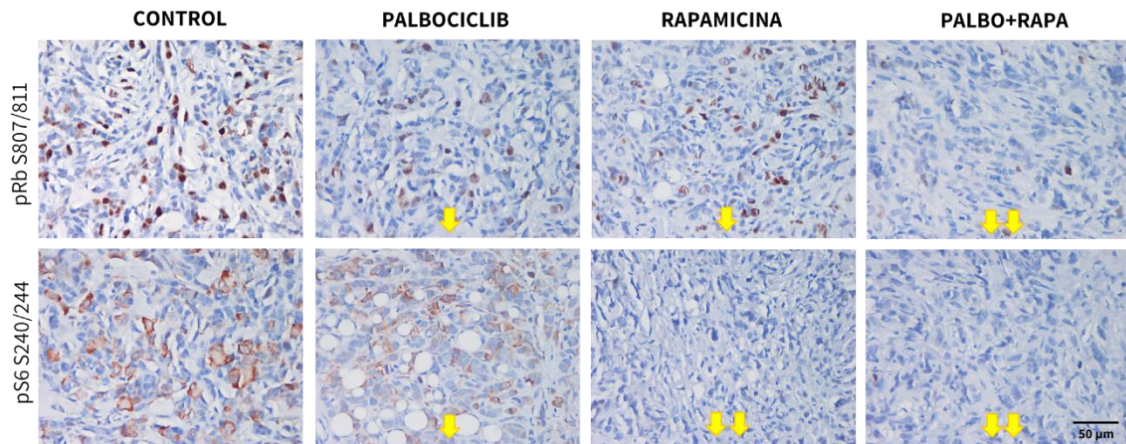


Figura 37. Efecto de rapamicina, palbociclib y su combinación sobre pRb y pS6 en los tumores T47D-TR. Se realizó inmunohistoquímica de los tumores tratados por 3 semanas con palbociclib, rapamicina y la combinación. Palbociclib y rapamicina de manera individual redujeron la presencia de células positivas para pRb y pS6, mientras que el tratamiento combinado produjo una reducción más marcada en ambas fosforilaciones. Puede observarse la localización principalmente nuclear de pRb y perinuclear de pS6.

En la Figura 38 analizamos el caso de los tumores resistentes a palbociclib T47D-PR tratados. Observamos que, a diferencia de lo observado *in vitro*, el tratamiento con palbociclib sí produce una disminución en la presencia de células positivas para pRb, no así el tratamiento con rapamicina solo. El tratamiento combinado de palbociclib con rapamicina logró inhibir en mayor medida la fosforilación de Rb. Por otro lado, no vemos cambios en la presencia de células positivas para pS6 con el tratamiento con palbociclib, mientras que tanto rapamicina sola como el tratamiento combinado lograron reducir por completo la fosforilación de S6.

T47D-PR

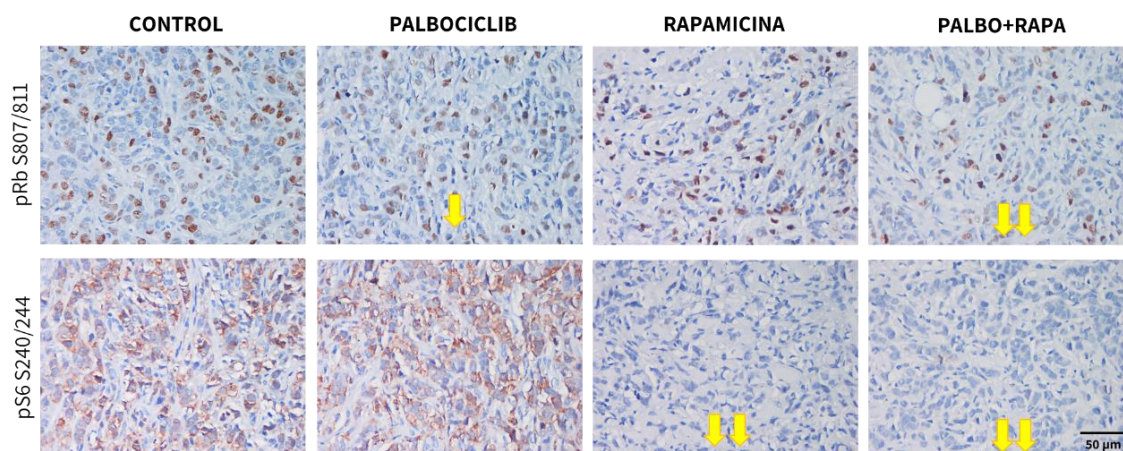


Figura 38. Efecto de rapamicina, palbociclib y su combinación sobre pRb y pS6 en los tumores T47D-PR. Se realizó inmunohistoquímica de los tumores tratados por 3 semanas con palbociclib, rapamicina y la combinación. Palbociclib redujo la presencia de células positivas para pRb, no así la rapamicina. El tratamiento combinado fue capaz de reducir en mayor medida la presencia de células positivas tanto para pRb como para pS6. Puede observarse la localización principalmente nuclear de pRb y perinuclear de pS6.

12) Efecto del tratamiento con inhibidores de CDK4/6 sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR a distintos tiempos.

Como señalamos en la última sección, nuestros resultados indican que el tratamiento con palbociclib no logra inhibir eficientemente la vía de PI3K/AKT/mTOR, en particular, la fosforilación de S6. Si bien mencionamos anteriormente que algunos trabajos afirman que el complejo ciclina D1/CDK4/6 regula positivamente la vía de PI3K/AKT/mTOR (Zacharek et al. 2005, Romero-Pozuelo et al. 2020), otros trabajos al igual que el nuestro, no observan disminución en la activación de esta vía al utilizar inhibidores de CDK4/6 (Herrera-Abreu et al. 2016, Zhang et al. 2016, Jansen et al. 2017). Para profundizar un poco más en esta observación contradictoria según el trabajo al que se refiera, decidimos evaluar el efecto de palbociclib sobre pS6 a distintos tiempos, en primer lugar, en la línea T47D-*wt*, sensible al tratamiento con esta droga.

En la Figura 39 podemos ver que, al igual que fue descrito en (Herrera-Abreu et al. 2016) el palbociclib disminuye la fosforilación de Rb recién luego de 24 horas de tratamiento, y esta fosforilación se restituye a partir de las 72 horas, a pesar de renovar el medio de cultivo y el inhibidor cada 48 horas. Por otra parte, vemos que el palbociclib reduce ligeramente la

fosforilación de S6 luego de 15 y 24 horas de tratamiento, pero a partir de las 48 horas esta inhibición deja de ocurrir.

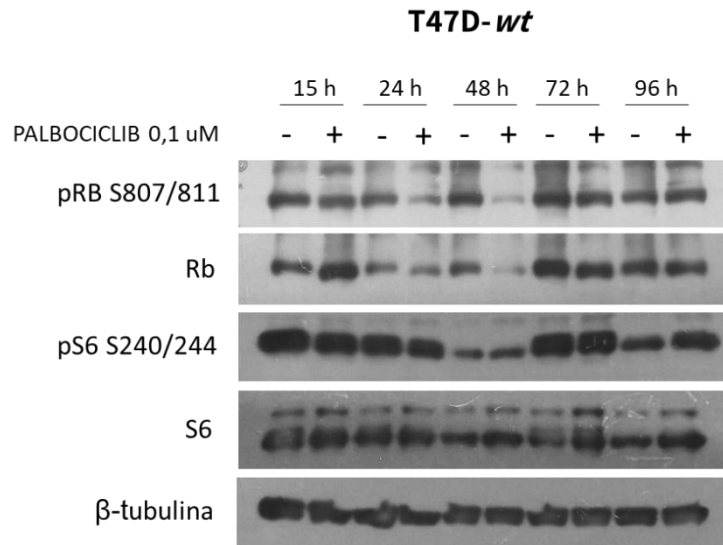


Figura 39. Efecto del tratamiento con palbociclib a distintos tiempos en la línea T47D-*wt*. Se realizaron extractos a distintos tiempos de tratamiento con palbociclib 0,1 uM. El palbociclib inhibe la fosforilación de Rb a las 24 y 48 horas, sin embargo, no es capaz de inhibir pS6 a partir de las 48 horas de tratamiento.

Analizamos luego por inmunofluorescencia el efecto de un tratamiento más prolongado con palbociclib en la línea T47D-*wt*. En la Figura 40 se puede observar que luego de 13 días de tratamiento con esta droga, la fosforilación de S6 también se mantiene estable. En esta imagen de microscopía además se puede observar nuevamente el efecto del palbociclib sobre el tamaño celular, destacando núcleos y citoplasmas más grandes que en las células control, lo cual ya fue mostrado y comentado en la Figura 13 al describir el proceso de selección con este inhibidor.

T47D-*wt*

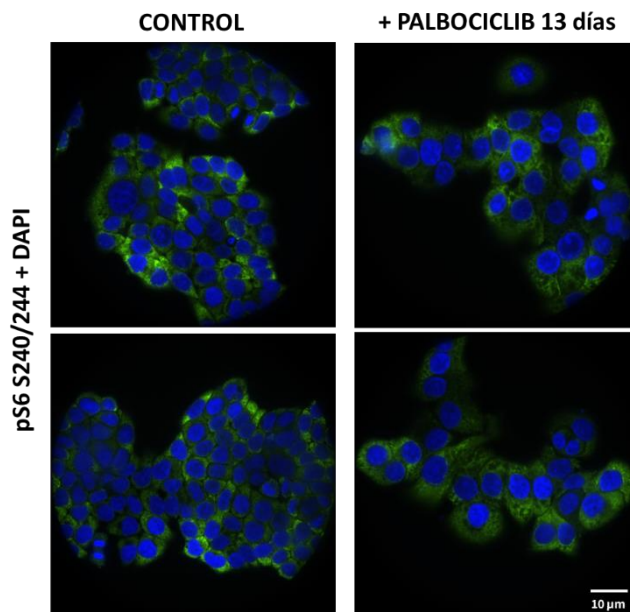


Figura 40. Efecto de palbociclib sobre pS6 en la línea T47D-*wt*. Se realizó inmunofluorescencia para pS6 en la línea T47D-*wt* con y sin tratamiento con palbociclib 0,5 uM por 13 días, renovando el medio de cultivo y el inhibidor cada 48 horas. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. La fosforilación de S6 se mantiene estable luego de la exposición prolongada a palbociclib. Puede observarse la localización principalmente citoplasmática de pS6.

A continuación, decidimos evaluar el efecto de palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR en otras líneas celulares, para contrastar estos resultados con los obtenidos en el modelo T47D. Utilizamos las líneas MCF-7-*wt* (sensible a palbociclib), T47D-PR (resistente a palbociclib), MDA-MB-231 *wild type* (triple negativa, sin mutaciones en *PIK3CA*) y JIMT-1 *wild type* (línea ER-/PR-, con amplificación de HER-2 y mutación C420R en *PIK3CA*).

En la Figura 41.A podemos ver que si bien palbociclib inhibió pRb a las 48 horas en MCF-7-*wt*, no logró modificar pAKT ni pS6 en ninguno de los tiempos evaluados. Lo mismo fue observado en el caso de la variante resistente a palbociclib T47D-PR. Además, es interesante destacar que, si bien ambas líneas presentan mutaciones activantes en el gen de *PIK3CA*, la línea T47D-PR presenta un nivel mayor de pAKT que la línea MCF-7-*wt*. Sin embargo, a pesar de los bajos niveles de pAKT en esta última variante, los niveles de pS6 son comparables entre ambas líneas celulares.

Por otra parte, si analizamos las líneas MDA-MB-231 y JIMT-1, vemos que en ambos casos pRb se inhibe luego de 48 y 96 horas de tratamiento con palbociclib. En el caso de la línea MDA-MB-231, vemos que el tratamiento no modifica los niveles de pS6 a ninguno de los dos tiempos, mientras que en las JIMT-1 palbociclib reduce los niveles de pAKT y pS6

pero esta inhibición se pierde luego de 96 horas de tratamiento. Por último, observamos que, al igual que en la línea MCF-7-*wt*, la fosforilación de AKT es menor en la línea MDA-MB-231 con respecto a la línea JIMT-1, lo cual podría deberse a la ausencia de mutación en *PIK3CA* en las MDA-MB-231. Sin embargo, nuevamente los niveles de pS6 entre ambas líneas son comparables (Figura 41.B).

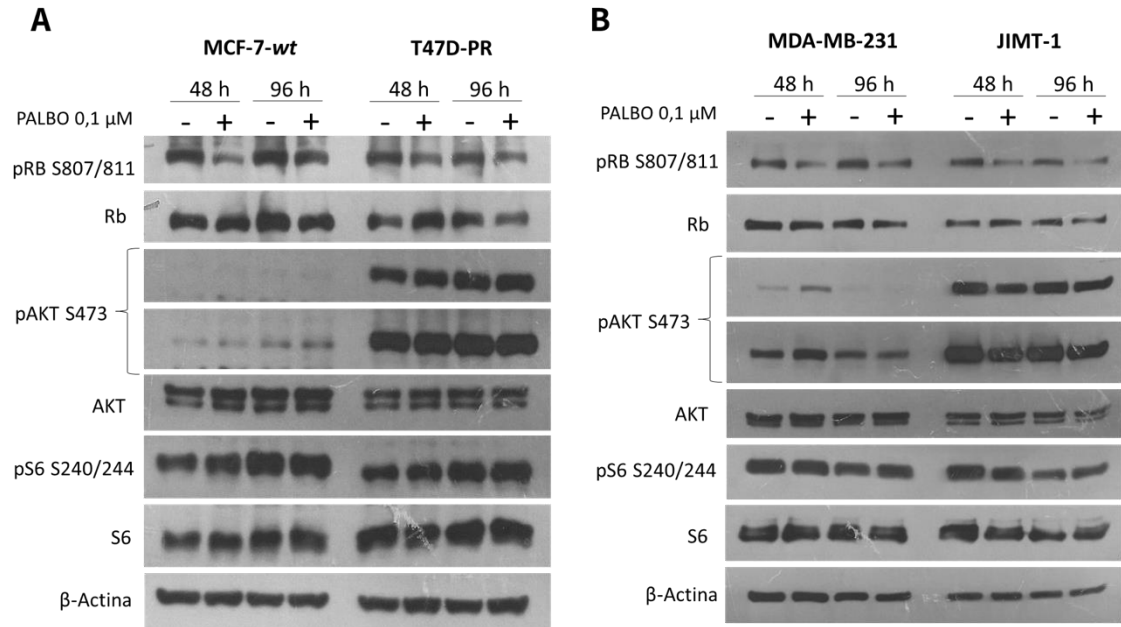


Figura 41. Efecto del tratamiento con palbociclib por 48 y 96 horas en las líneas MCF-7-*wt*, T47D-PR, MDA-MB-231 y JIMT-1. Se realizaron extractos luego de 48 o 96 horas de tratamiento con palbociclib (PALBO) 0,1 uM. A) El palbociclib inhibe la fosforilación de Rb luego de 48 horas de tratamiento en MCF-7-*wt* y T47D-PR, sin embargo, no es capaz de modificar pAKT ni pS6. Se muestran dos tiempos distintos de exposición de placa radiográfica para pAKT. B) El palbociclib inhibe pRb, sin embargo, no es capaz de modificar pAKT ni pS6 en MDA-MB-231 ni en JIMT-1 luego de 96 horas de tratamiento. Se muestran dos tiempos distintos de exposición de placa radiográfica para pAKT.

Por último, decidimos evaluar si otros inhibidores de CDK4/6, como el ribociclib o el abemaciclib, eran capaces de inhibir la vía de PI3K/AKT/mTOR, como fue reportado en (Litchfield et al. 2020, Romero-Pozuelo et al. 2020). Esto fue analizado únicamente en la línea T47D-*wt*. En la Figura 42 podemos ver que tanto a 48 como a 96 horas, abemaciclib fue el agente más eficiente en inhibir tanto la fosforilación de Rb como de S6, y este efecto ocurriría *downstream* AKT, ya que la fosforilación de esta proteína no se ve modificada. Cabe resaltar que el abemaciclib también fue el más eficiente en inhibir la proliferación de las líneas T47D-*wt* y resistentes como se mostró en la Figura 19.B, donde vemos que a iguales dosis de los 3 inhibidores de CDK4/6, los porcentajes de inhibición son mayores con abemaciclib. Es por eso que sería interesante en el futuro evaluar el efecto combinado de abemaciclib con

inhibidores de mTOR, esperando encontrar un efecto antitumoral aún mayor que con el palbociclib.

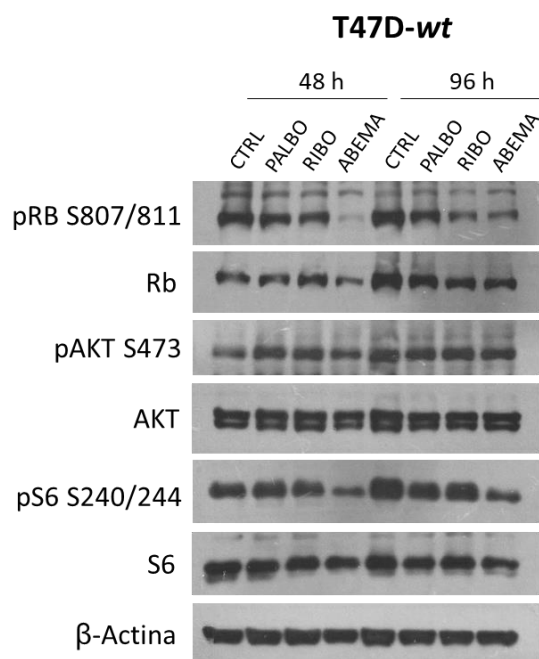


Figura 42. Efecto del tratamiento con palbociclib, ribociclib y abemaciclib por 48 y 96 horas en la línea T47D-wt. Se realizaron extractos luego de 48 o 96 horas de tratamiento con palbociclib (PALBO), ribociclib (RIBO) o abemaciclib (ABEMA) 0,1 μ M. Abemaciclib fue el más eficiente en inhibir la fosforilación de Rb y de S6, tanto a 48 como a 96 horas de tratamiento.

Estos resultados, si bien preliminares, sostienen la idea de que el tratamiento combinado de palbociclib o de otros inhibidores de CDK4/6 con inhibidores de mTOR sería necesario para obtener una completa inhibición tanto del eje ciclina D1/CDK4/6/Rb como de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de pS6. Esta combinación podría evitar una reactivación de la vía *downstream* AKT y así retrasar el desarrollo de resistencia. Esto es prometedor incluso para los casos donde no existan mutaciones activantes del gen de *PIK3CA*.

En las secciones 9-12 vimos que:

- ✓ Las variantes T47D resistentes son sensibles a distintos inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR. Incluso, rapamicina (inhibidor mTORC1) es más efectivo inhibiendo la proliferación que alpelisib (inhibidor PI3K α) en las variantes T47D-TR y T47D-PR.
- ✓ En todas las variantes resistentes la combinación de rapamicina con palbociclib inhibió la proliferación más eficientemente que cada droga por separado, logrando con dicha combinación una mayor inhibición de la fosforilación de Rb, de la expresión de proteínas del ciclo celular, y de la fosforilación de S6.
- ✓ La combinación de rapamicina con palbociclib *in vivo* produjo una mayor inhibición en pRb y pS6 tanto en los tumores T47D-TR como en los T47D-PR, pero solo en los tumores T47D-TR se logra una mayor inhibición del crecimiento tumoral que con cada droga por separado.
- ✓ El tratamiento con palbociclib no fue capaz de inhibir la fosforilación de AKT ni de S6 a partir de 48 horas de tratamiento en distintas líneas celulares (T47D, MCF-7, MDA-MB-231 y JIMT-1). Sin embargo, el abemaciclib, además de ser más efectivo en inhibir pRb que palbociclib, logró inhibir pS6 en la línea T47D-*wt*.

RESUMEN DE RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES

A grandes rasgos podemos decir que:

- El tratamiento prolongado con tamoxifeno y palbociclib afecta la morfología celular, disminuye la tasa de proliferación y las uniones intercelulares, pudiendo inducir mayor migración celular (en el caso del modelo MCF-7). Estos tratamientos inducen una disminución en la expresión de ER y PR y un aumento en la expresión de proteínas del ciclo celular, así como también un aumento en la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR. La resistencia al tamoxifeno en particular se asocia además con un enriquecimiento en células con características de células madre tumorales.
- El tratamiento con inhibidores de mTOR podría ser más efectivo que el tratamiento con inhibidores de PI3K, tanto en casos de resistencia a tamoxifeno como a palbociclib. Además, la combinación de inhibidores de mTOR con palbociclib sería más efectiva que la utilización de cada droga de forma individual, tanto disminuyendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral como inhibiendo la activación del eje Rb y de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de S6.

En la Figura 43 se puede ver un esquema representativo de las alteraciones observadas en la vía de PI3K/AKT/mTOR y ciclo celular en las variantes resistentes frente al tratamiento prolongado con tamoxifeno y palbociclib. Encontramos que ambos tratamientos reducen la expresión del ER, son capaces de inducir una mayor activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a nivel de pAKT o de pS6, e incluso aumentar la expresión de PKC α . A nivel del ciclo celular, encontramos que en determinados casos estos tratamientos pueden conducir a una reducción en la expresión de Rb o a un aumento en otras proteínas del ciclo celular como ciclina D1, ciclina E2, CDK4, CDK6 y CDK1, algunas de las cuales se encuentran involucradas en complejos *downstream* que permitirían evadir la inhibición a nivel de CDK4/6. Encontramos además que combinar el tratamiento de palbociclib con inhibidores de mTOR logra reducir en mayor medida la proliferación y el crecimiento tumoral, inhibiendo tanto pRb como pS6 y evitando de esta forma una sobreactivación de la vía de PI3K/AKT/mTOR que podría ocurrir como consecuencia directa del tratamiento con palbociclib o como mecanismo de escape celular. Por último, es interesante resaltar que en nuestros modelos los inhibidores de mTOR, principalmente el AZD2014, son capaces de inhibir la fosforilación de Rb aún al ser utilizados como monodroga, sugiriendo que podrían existir otros puntos de interacción entre estas vías que sería interesante estudiar en mayor profundidad.

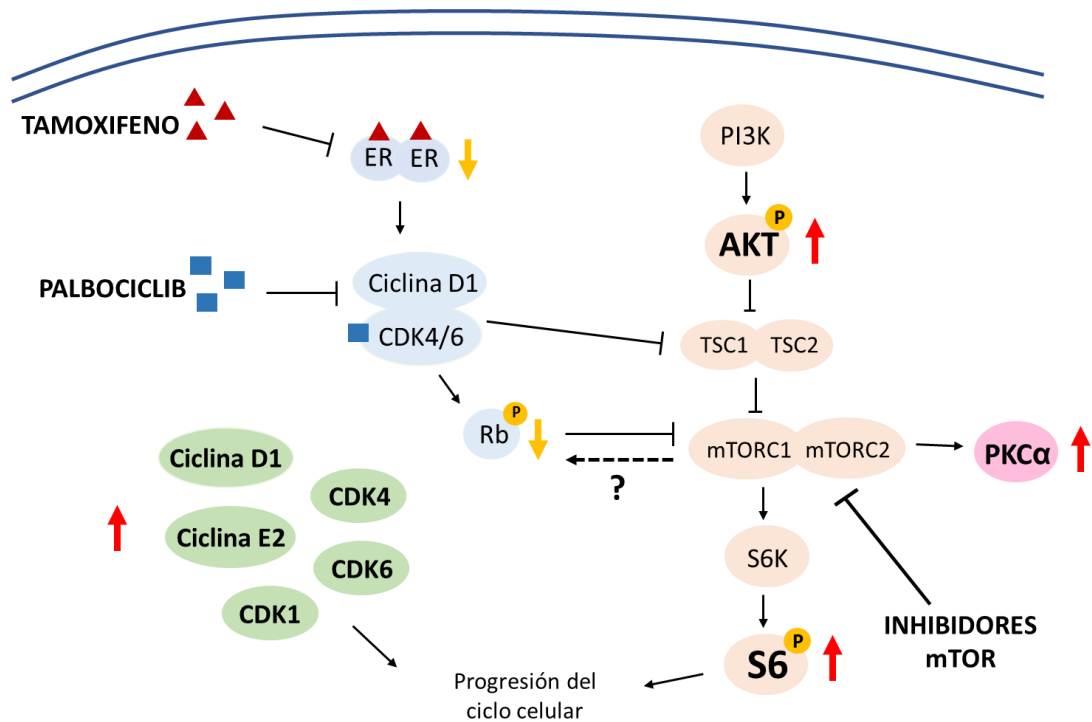


Figura 43. Esquema representativo de las alteraciones observadas en las variantes resistentes frente al tratamiento con tamoxifeno y palbociclib.

RESULTADOS EN XENOTRASPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDX)

TERCERA PARTE: CARACTERIZACIÓN DE PDXs PROVENIENTES DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ER+.

Esta parte del trabajo fue realizada en el laboratorio dirigido por la Dra. Violeta Serra (Grupo de Terapéutica Experimental, Instituto de Oncología Vall D'Hebron, España) y con ayuda de la Dra. Marta Palafox, gracias a una beca de formación en oncología otorgada por la Fundación Bunge y Born. El laboratorio cuenta con un biobanco con más de 80 PDXs de carcinomas de mama. A partir de una biopsia de una paciente con cáncer de mama, se obtiene un pequeño fragmento del tumor el cual es implantado en ratones inmunosuprimidos. Una vez que el tumor se establece y empieza a crecer, pequeños fragmentos del mismo son trasplantados a otros ratones hasta el establecimiento definitivo del modelo PDX (Figura 44).

Para este trabajo utilizamos 9 PDXs establecidos a partir de tumores de mama ER+. Las mutaciones y alteraciones genómicas de los mismos fueron analizadas previamente utilizando el panel de genes MSK-IMPACT (Cheng et al. 2015), el cual evalúa 410 genes comúnmente alterados en cáncer. Algunas de las alteraciones relevantes a las vías de señalización analizadas en este trabajo se citan en la Figura 45. Como se puede ver, 4 de los PDXs utilizados para este trabajo presentan mutaciones o amplificaciones del gen de *PIK3CA*.

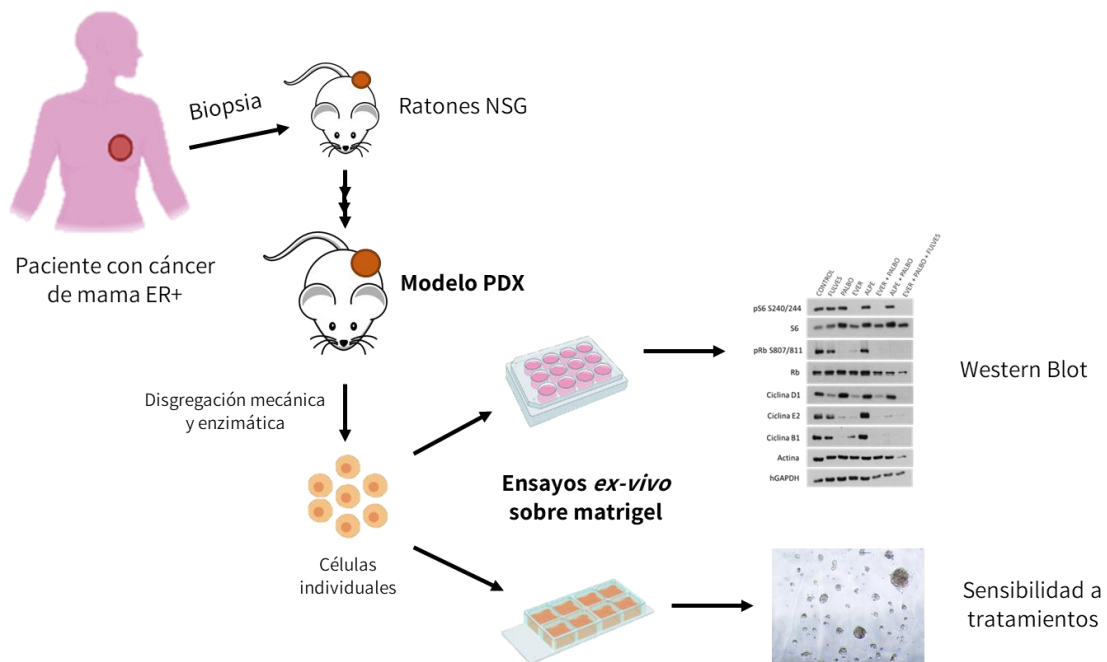


Figura 44. Esquema del establecimiento de modelos PDX y experimentos realizados a partir de células individuales obtenidas de los mismos. Un pequeño fragmento de tumor proveniente de una paciente con cáncer de mama ER+ es implantado en ratones NSG hasta obtener un modelo PDX estable. A partir de una porción del tumor establecido en ratones se obtuvieron células individuales que fueron utilizadas para realizar ensayos *ex-vivo* sobre matrigel.

PDX	Alteración genómica
PDX446	<i>PIK3CA G118D, PIK3CA Amp, PTEN X268_splice, AKT2 F35C, RPS6KB2 DeepDel</i>
PDX447	<i>PIK3CA H1047R, ESR1 D538G</i>
PDX343	<i>PIK3CA Amp, ESR1 Amp</i>
PDX479	<i>PIK3CA H1047R, PIK3CA H1048R, AKT1 Amp</i>
PDX39	<i>AKT1 DeepDel, TSC1 DeepDel</i>
PDX313	<i>AKT1 E17K, AKT3 Amp, MTOR W1456G</i>
PDX476	<i>RPS6KB2 DeepDel, CCND1 Amp, ESR1 Amp</i>
PDX346	<i>CCND1 Amp</i>
PDX474	-

Figura 45. Alteraciones genómicas en la vía de PI3K/AKT/mTOR, ER y ciclo celular en los PDXs utilizados en este trabajo.

Los ensayos con PDXs se realizaron de forma *ex-vivo*, es decir, a partir de una porción de cada tumor crecido *in vivo* en el ratón, se realizó una disgregación mecánica y enzimática (ver Materiales y Métodos) hasta obtener células individuales (Figura 44). Las mismas fueron utilizadas para realizar ensayos 3D. A partir de este momento, si bien nos referiremos a cada PDX con su número, en todos los casos hay que tener presente que son ensayos *ex-vivo* a partir de las células obtenidas de cada uno de los tumores.

Las células disgregadas fueron sembradas sobre una fina capa de Matrigel colocada previamente en las placas de cultivo. Realizamos cultivos en condiciones basales y con tratamientos, los cuales luego fueron procesados para obtener extractos proteicos que fueron analizados por western blot, o para evaluar la sensibilidad a drogas. El medio condicionado de estos cultivos fue recolectado y será utilizado en el futuro para evaluar la presencia determinados microRNAs asociados con las vías de interés.

Los extractos proteicos fueron realizados luego de 30 horas de tratamiento con los distintos inhibidores. En el caso de los ensayos de sensibilidad a drogas, a las 48 horas de plaqueadas las células, se comenzaron los tratamientos, que duraron 7 días, renovando el medio y los inhibidores día por medio. El último día se tomaron fotos de cada condición, para medir el tamaño de las esferas formadas mediante el programa Image J. El tamaño promedio de las esferas para cada condición fue relativizado al tamaño de las esferas del control (sin tratamiento), para poder estimar la sensibilidad a los tratamientos, como se observa en el ejemplo de la Figura 46. Este método de evaluación del crecimiento por medición del tamaño de las esferas fue previamente validado en el laboratorio de la Dra. Serra mediante medición y comparación con el porcentaje de células en fase S del ciclo utilizando ensayos de incorporación de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU).

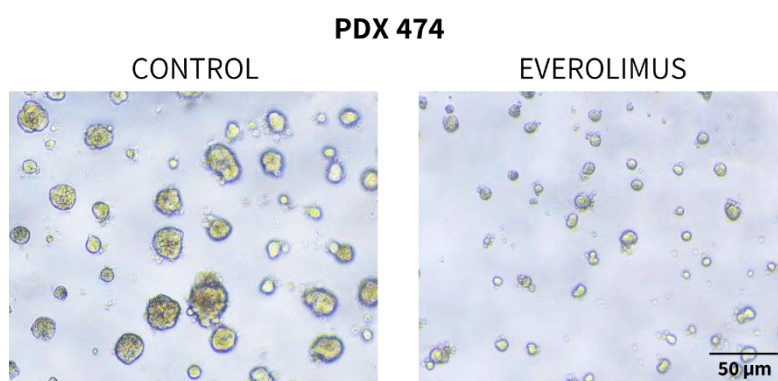


Figura 46. Esferas formadas por células provenientes del PDX 474 sembradas *ex-vivo* sobre Matrigel. A modo de ejemplo se muestran fotos en campo claro representativas del tratamiento con everolimus en células obtenidas a partir del PDX 474 y cultivadas por 7 días en presencia o ausencia del inhibidor.

13) Evaluación *ex-vivo* de la sensibilidad de los PDXs a tamoxifeno y palbociclib.

El primer paso fue analizar la sensibilidad de cada PDX a tamoxifeno y a palbociclib, para ser agrupados luego en sensibles o resistentes, y de esta manera poder comparar más fácilmente los resultados con los de las líneas celulares generadas en nuestro laboratorio.

Se realizaron gráficos conocidos como de cascada o *waterfalls*, para visualizar la respuesta de cada PDX al tratamiento con tamoxifeno 0,1 uM y palbociclib 0,5 uM. Para realizar estos gráficos, se relativizó el área promedio de las esferas tratadas al área de las esferas control (sin tratamiento), y se graficó ese porcentaje ya relativizado. Los PDXs cuya inhibición dio diferencias significativas frente a su respectivo control sin tratamiento, fueron agrupados como sensibles, mientras que los que no mostraron diferencias significativas fueron agrupados como resistentes. Como se puede observar en la Figura 47, los PDXs 446, 343 y 479 fueron sensibles tanto a tamoxifeno como a palbociclib. Por otro lado, el PDX 474 fue sensible a tamoxifeno, pero no a palbociclib (flechas azules); y el PDX 39 fue sensible a palbociclib, pero no a tamoxifeno (flechas rojas). Los PDXs 313, 346, 476 y 447 resultaron resistentes a ambas drogas.

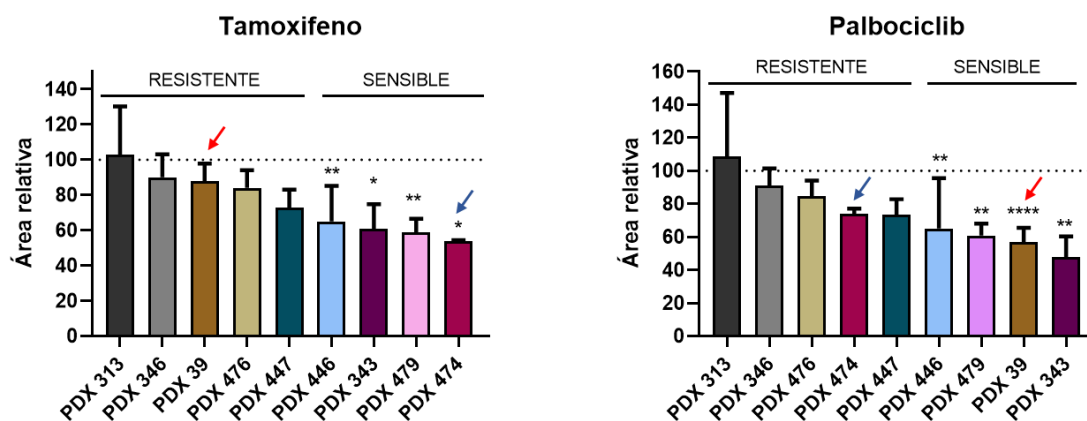


Figura 47. Sensibilidad a tamoxifeno y palbociclib de los PDXs *ex-vivo*. Las células provenientes de PDXs fueron tratadas por 7 días con tamoxifeno 0,1 uM o palbociclib 0,5 uM. Se graficó el área de las esferas con tratamiento relativizada al área de las esferas control (sin tratamiento). Los PDXs 446, 343 y 479 son sensibles a tamoxifeno y palbociclib. El PDX 474 es sensible a tamoxifeno, pero no a palbociclib (flechas azules) mientras que el PDX 39 es sensible a palbociclib, pero no a tamoxifeno (flechas rojas). Los PDXs 313, 346, 476 y 447 son resistentes a ambas drogas. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

14) Activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y expresión de proteínas del ciclo celular.

El siguiente paso fue realizar extractos proteicos de los PDXs en condiciones basales, sin tratamiento, para analizar la expresión y activación de proteínas de la vía de PI3K/AKT/mTOR y del ciclo celular. Debido a la disponibilidad de PDXs y a la cantidad de células obtenidas a partir de los mismos pudimos realizar extractos de 7 PDXs. En los casos donde tuvimos disponibilidad suficiente de material realizamos duplicados. Utilizamos un extracto de T47D-*mt* como control.

En la Figura 48 se puede observar el western blot de los distintos PDXs. Se utilizó actina como control de carga y un anticuerpo anti GAPDH humano para verificar que la expresión proteica observada se debe principalmente a las células humanas de los PDXs y no a fibroblastos de ratón que puedan haber quedado luego de la disgregación de los tumores. Para facilitar el análisis de los resultados, agrupamos a los PDXs según su resistencia o sensibilidad a tamoxifeno o a palbociclib (en base a los resultados de la Figura 47), con excepción del PDX 39, marcado en rojo, el cual es resistente a tamoxifeno, pero sensible a palbociclib. De esta manera comparamos la expresión de las proteínas en el grupo de resistentes frente al grupo sensible.

Analizamos la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR a través de la expresión de PTEN y la fosforilación de AKT y S6. En la Figura 48.A vemos que la expresión de PTEN se mantiene constante entre los distintos PDXs independientemente de su sensibilidad o resistencia a tamoxifeno y palbociclib, con excepción del PDX 446, el cual presenta alteraciones en este gen (Figura 45). Este PDX presenta, consecuentemente con la disminución de PTEN, una alta fosforilación de AKT, principalmente en T308. Por otra parte, vemos un marcado aumento en pS6 en el PDX 39, lo cual se podría asociar a la delección en *TSC1* que posee, la cual elimina la inhibición de mTOR ejercida por el complejo TSC1/TSC2, aumentando así la activación de S6, proteína *downstream* mTOR. Observamos además que la mayoría de los PDXs presentan baja activación de AKT, principalmente en S473, mientras que presentan alta activación en S6. Es decir, nuevamente vemos que no siempre la activación a nivel de AKT se correlaciona con la activación *downstream* a nivel de S6. Incluso, si tenemos en cuenta que los primeros 4 PDXs (recuadro azul) son los que presentan mutaciones activantes o alteraciones en el gen de *PIK3CA*, podemos ver que tampoco la presencia de estas alteraciones se correlaciona siempre con una mayor activación de la vía a nivel de AKT o S6.

A continuación, analizamos la expresión de proteínas del ciclo celular. No vemos una asociación marcada entre la expresión de Rb y la resistencia a palbociclib. Sin embargo, cuando agrupamos los PDXs en sensibles y resistentes a tamoxifeno, podemos observar que el grupo de los PDXs resistentes a tamoxifeno muestra una tendencia al aumento en ciclina E2 (Figura 48.B, recuadro rojo), similar a lo observado previamente en la línea resistente a tamoxifeno T47D-TR (Figura 25.A). También podemos observar que el PDX 346, que presenta una amplificación del gen de ciclina D1, muestra un marcado aumento en la expresión no solo de esta ciclina sino también de ciclina E2 y ciclina B1.

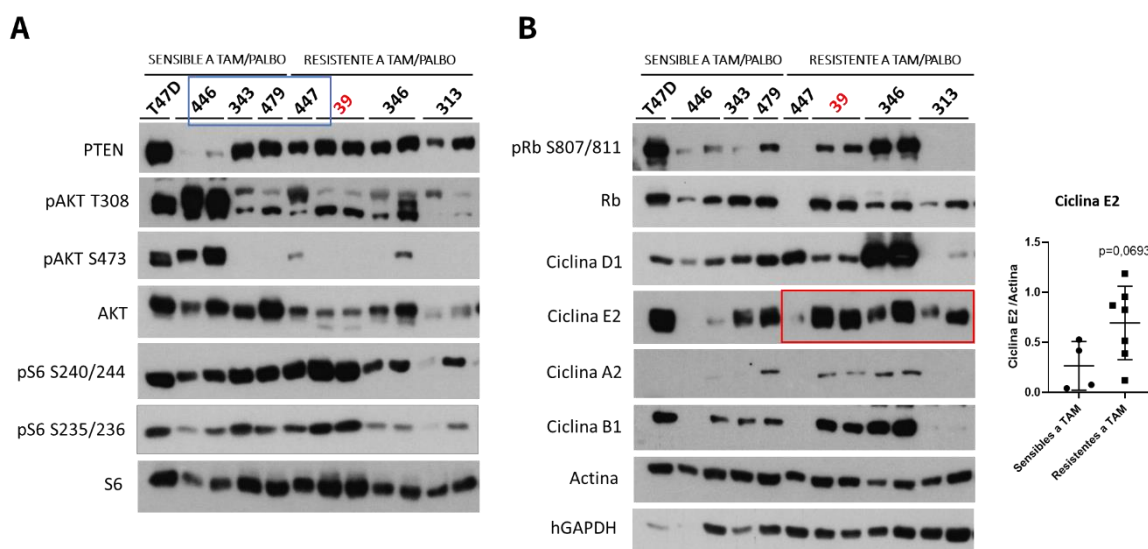


Figura 48. Vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular en los PDXs. Se realizaron western blot de extractos proteicos totales de células provenientes de PDXs en condiciones basales. A) La presencia de alteraciones en *PIK3CA* (PDXs recuadrados en azul) no siempre se correlaciona con mayor activación en AKT o S6. Tampoco existe correlación directa entre pAKT y pS6. B) Los PDXs resistentes a tamoxifeno muestran una tendencia al aumento en la expresión de ciclina E2 (recuadro rojo). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y relativizadas a actina como control de carga. Tener en cuenta que algunos PDXs fueron corridos por duplicado en el mismo gel.

15) Evaluación *ex-vivo* de la sensibilidad de los PDXs a alpelisib y everolimus.

A continuación, decidimos evaluar la respuesta de los PDXs a inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR, en particular alpelisib (inhibidor PI3K α) y everolimus (inhibidor mTORC1), ambos inhibidores aprobados para su uso en la clínica.

Nuevamente realizamos los ensayos 3D *ex-vivo* mencionados anteriormente y graficamos los resultados en *waterfalls*, de menor a mayor respuesta a alpelisib 1 uM y everolimus 0,1 uM. Al igual que previamente, consideramos resistentes aquellos PDXs cuya

inhibición con la droga no dio diferencias significativas frente a su respectivo control, y sensibles a los que sí. Como podemos observar en la Figura 49, dos PDXs (474 y 313) fueron resistentes a alpelisib, mientras todos los PDXs fueron sensibles a everolimus, incluso utilizando una dosis 10 veces menor que la de alpelisib. En el caso del PDX 313, podemos ver que este expresa niveles más bajos de pAKT y pS6 con respecto al resto de los PDXs (Figura 48.A), posiblemente afectando su respuesta al inhibidor de PI3K alpelisib.

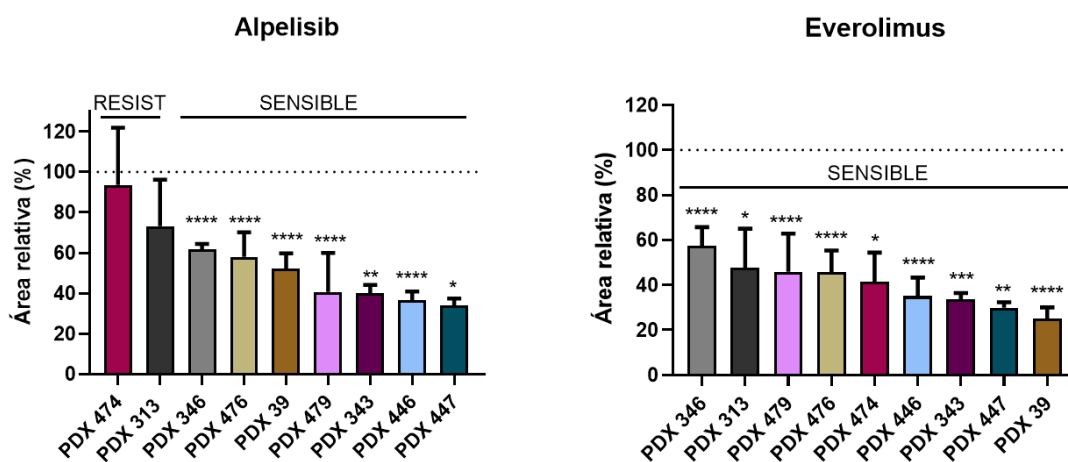


Figura 49. Sensibilidad a alpelisib y everolimus de los PDXs *ex-vivo*. Las células provenientes de PDXs fueron tratadas por 7 días con alpelisib 1 uM o everolimus 0,1 uM. Se graficó el área de las esferas con tratamiento relativizada al área de las esferas control. Los PDXs 474 y 313 son resistentes a alpelisib, mientras que el resto de los PDXs son sensibles. Todos los PDXs respondieron a everolimus. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

Decidimos luego evaluar si la respuesta de los PDXs a alpelisib y everolimus estaba asociada a la presencia de mutaciones en el gen de *PIK3CA* o a genes *downstream* de la vía de PI3K/AKT/mTOR. En la Figura 50 podemos ver que los dos PDXs resistentes a alpelisib, PDX 474 y 313, no presentan mutaciones en *PIK3CA*, mientras que el PDX 313 sí presenta alteraciones en genes *downstream* como *AKT1*, *AKT3* y *MTOR*. Por otro lado, si analizamos los PDXs sensibles a alpelisib, vemos que 4 de 7 PDXs presentan alteraciones en *PIK3CA*, ya sea mutaciones o amplificaciones. Incluso los PDX 39 y 476 si bien no tienen mutaciones en *PIK3CA*, sí presentan deleciones en genes de la vía. Por último, vemos que independientemente de la presencia de mutaciones en *PIK3CA* o en genes *downstream*, todos los PDXs fueron sensibles a everolimus.

	PDX 474	PDX 313	PDX 346	PDX 39	PDX 476	PDX 479	PDX 446	PDX 343	PDX 447
ALPELISIB	RESISTENTE	RESISTENTE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
EVEROLIMUS	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE
<i>PIK3CA</i>						mut	mut	amp	mut
<i>PTEN</i>							mut		
<i>AKT1</i>		mut		del		amp			
<i>AKT2</i>							mut		
<i>AKT3</i>		amp							
<i>TSC1</i>				del					
<i>MTOR</i>		mut							
<i>RPS6KB2</i>					del		del		

Figura 50. Alteraciones genómicas de la vía de PI3K/AKT/mTOR en los PDXs. Los PDXs resistentes a alpelisib presentan *PIK3CA wt*, mientras que 4/7 PDXs sensibles a alpelisib presentan alteraciones en *PIK3CA*. Todos los PDXs son sensibles a everolimus independientemente de las alteraciones en *PIK3CA* y en genes *downstream*.

16) Efecto de la combinación de inhibidores de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib.

A continuación, decidimos analizar el efecto sobre el crecimiento de las células *ex-vivo* al combinar inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib, y también incorporando fulvestrant como triple tratamiento, ya que en la clínica por el momento estos inhibidores se utilizan siempre en combinación con terapia hormonal. Se muestran a continuación los resultados de los ensayos en 3 PDXs representativos. El primer caso analizado es el PDX 446, el cual presenta mutaciones en *PIK3CA*, es sensible a tamoxifeno y palbociclib, así como también a alpelisib y everolimus. En la Figura 51.A observamos que no hay una inhibición significativamente mayor al combinar los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR con palbociclib y con fulvestrant, con respecto al efecto de los inhibidores individuales. Sin embargo, debido a que el grado de inhibición con alpelisib y everolimus como drogas únicas ya es muy alto, sería interesante evaluar a futuro dosis menores de los inhibidores para dejar un margen mayor de inhibición para los dobles y triples tratamientos.

Por otra parte, analizamos mediante western blot la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular frente al tratamiento con estos inhibidores por 30 horas. En la figura 51.B podemos observar que el tratamiento con palbociclib, al igual que habíamos observado en las líneas celulares, si bien inhibe la fosforilación de Rb, no produce cambios sobre pAKT ni pS6. Además, aumenta la expresión de ciclina D1, lo cual

también fue observado en las líneas celulares. Por otro lado, vemos que alpelisib reduce pAKT, pS6 y pRb. El tratamiento con everolimus solo o combinado con palbociclib reduce en mayor medida la fosforilación de S6, Rb e incluso la expresión de ciclina D1. Si analizamos el triple tratamiento incorporando fulvestrant, podemos ver que esta combinación es más afectiva aún, ya que se inhiben pS6, pRb y la expresión de ciclina D1 en mayor medida.

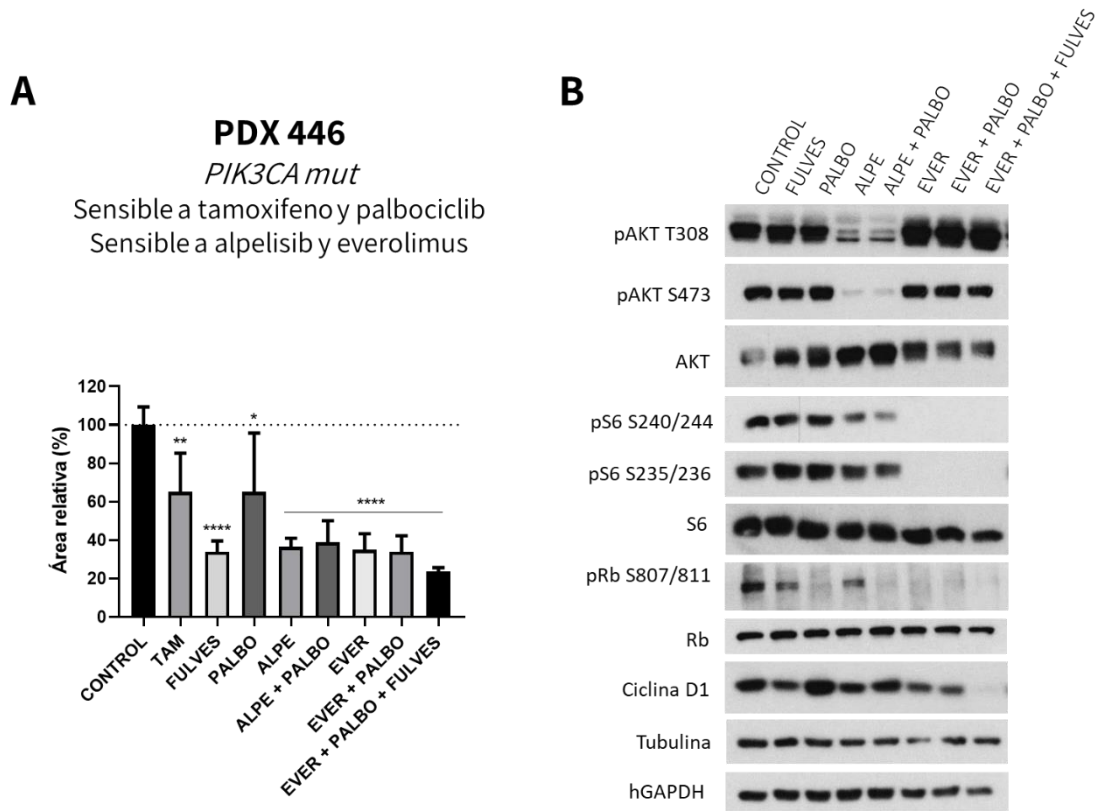


Figura 51. Combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y fulvestrant en el PDX 446. A) Se analizó la sensibilidad *ex-vivo* a tamoxifeno (TAM) 0,1 uM, fulvestrant (FULVES) 0,1 uM, palbociclib (PALBO) 0,5 uM, alpelisib (ALPE) 1 uM, everolimus (EVER) 0,1 uM y sus combinaciones. El PDX 446 responde a todos los inhibidores utilizados, sin embargo, las combinaciones no muestran mayor inhibición que las respectivas drogas individuales. B) Se realizó western blot de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con los inhibidores en las concentraciones citadas. El tratamiento con everolimus, reduce pS6, pRb y la expresión de ciclina D1 en mayor medida que alpelisib. La triple combinación es la que presenta mayor inhibición de ciclina D1. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

El segundo caso analizado es el del PDX 39. Este PDX tiene *PIK3CA wild type* pero presenta delección de *TSC1* y *AKT1*, genes *downstream* PI3K. Es resistente a tamoxifeno, pero sensible a palbociclib, alpelisib y everolimus. Observamos un mayor porcentaje de inhibición de everolimus con respecto a alpelisib, debido posiblemente a las mutaciones presentes en la

vía de PI3K/AKT/mTOR mencionadas anteriormente (Figura 52.A). A su vez, es interesante destacar que, si bien este PDX es resistente a tamoxifeno, responde a fulvestrant. Nuevamente la combinación de everolimus con palbociclib y fulvestrant no muestra mayor inhibición a nivel proliferativo, que ya se encuentra muy inhibida con everolimus solo. Cuando analizamos el efecto de los tratamientos sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular, vemos nuevamente que, si bien palbociclib logra inhibir pRb, no inhibe pS6. Por otro lado, everolimus disminuye la fosforilación de Rb y de S6, al mismo tiempo que reduce la expresión de ciclina D1, ciclina E2 y ciclina B1, mientras que el tratamiento con alpelisib no produce ninguno de estos efectos. El triple tratamiento nuevamente es el que muestra mayor efectividad inhibiendo ciclina D1 (Figura 52.B).

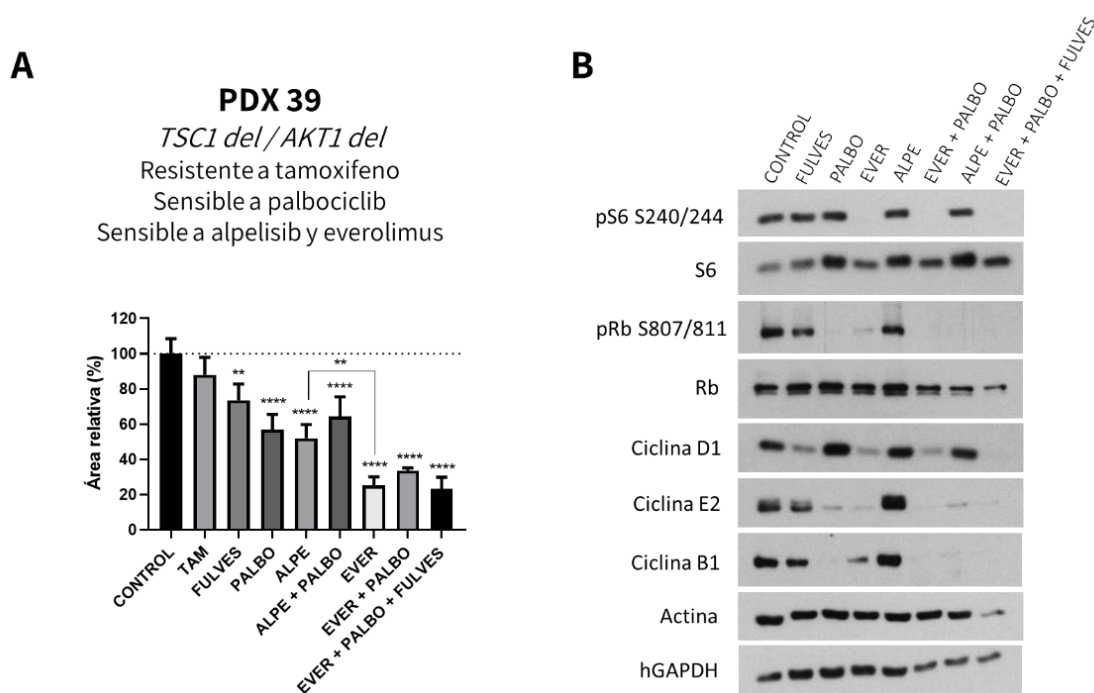


Figura 52. Combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y fulvestrant en el PDX 39. A) Se analizó la sensibilidad *ex-vivo* a tamoxifeno (TAM) 0,1 uM, fulvestrant (FULVES) 0,1 uM, palbociclib (PALBO) 0,5 uM, alpelisib (ALPE) 1 uM, everolimus (EVER) 0,1 uM y sus combinaciones. El PDX 39 responde tanto a alpelisib como a everolimus, sin embargo, muestra mayor porcentaje de inhibición con everolimus. B) Se realizó un western blot de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con los inhibidores citados. Everolimus disminuye pRb y pS6, al mismo tiempo que reduce la expresión de ciclina D1, E2 y B1, mientras que el tratamiento con alpelisib no produce ninguno de estos efectos. El triple tratamiento es el que muestra mayor efectividad inhibiendo ciclina D1. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

Por último, en la Figura 53 analizamos el caso del PDX 313. Este PDX presenta mutaciones en *AKT1* y *MTOR*, es resistente a tamoxifeno, palbociclib y alpelisib pero es

sensible a everolimus. A nivel proliferativo solo vemos inhibición con everolimus (Figura 53.A). Además, cuando analizamos por western blot la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular, vemos que el everolimus, sólo o en combinación con palbociclib o fulvestrant, produce una drástica disminución de pS6, ciclina D1 y ciclina E2, lo cual no se observa con el alpelisib. En este caso el tratamiento con palbociclib tampoco modifica el nivel de fosforilación de S6 (Figura 53.B).

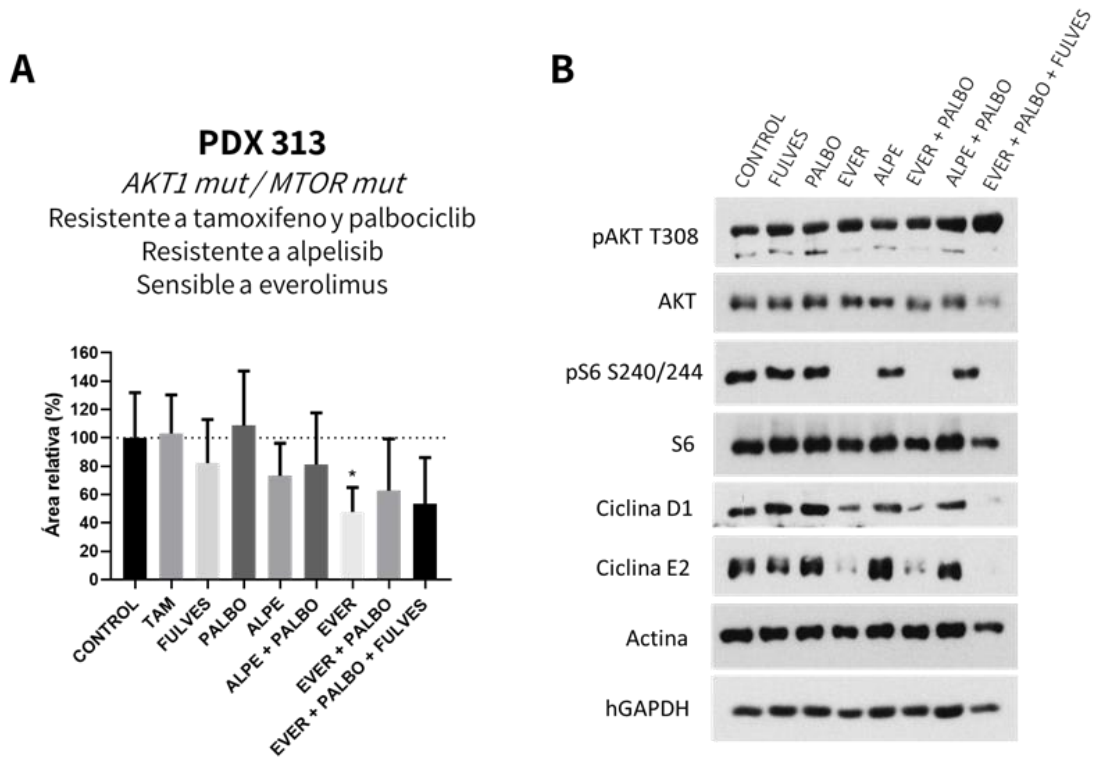


Figura 53. Combinación de palbociclib con inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y fulvestrant en el PDX 313. A) Se analizó la sensibilidad *ex-vivo* a tamoxifeno (TAM) 0,1 uM, fulvestrant (FULVES) 0,1 uM, palbociclib (PALBO) 0,5 uM, alpelisib (ALPE) 1 uM, everolimus (EVER) 0,1 uM y sus combinaciones. El PDX 313 solo responde a everolimus. B) Se realizó western blot de extractos proteicos totales luego de 30 horas de tratamiento con los inhibidores citados. El tratamiento con everolimus, así como sus combinaciones con palbociclib y fulvestrant, producen una drástica disminución de pS6, ciclina D1 y ciclina E2, lo cual no ocurre con el tratamiento con alpelisib. *p<0.05 **p<0.01 ****p<0.0001.

En las secciones 13-16 vimos que:

- ✓ Los PDXs resistentes a tamoxifeno mostraron una tendencia al aumento en la expresión de ciclina E2, al igual que habíamos visto en las líneas celulares.
- ✓ La activación de pS6 no necesariamente se correlaciona con la activación de pAKT y con la presencia de mutaciones en *PIK3CA*.
- ✓ Todos los PDXs fueron sensibles al inhibidor de mTORC1 everolimus, independientemente de la presencia de mutaciones en *PIK3CA* y alteraciones *downstream*.
- ✓ El everolimus resultó más efectivo que el alpelisib en combinación con palbociclib, inhibiendo la fosforilación de Rb y S6 y la expresión de proteínas del ciclo celular. La triple combinación palbociclib + everolimus + fulvestrant sería aún más efectiva que la combinación doble palbociclib + everolimus.

Podemos decir entonces que utilizando modelos de PDX confirmamos que, al igual que en líneas celulares, el tratamiento combinado de palbociclib con inhibidores de mTOR logra una mayor inhibición tanto del eje ciclina D1/CDK4/6/Rb como de la vía de PI3K/AKT/mTOR, inclusive para los casos donde no existan mutaciones activantes del gen de *PIK3CA*.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

- **Utilidad de modelos experimentales preclínicos.**

Como mencionamos en la Introducción, aunque el uso de inhibidores hormonales y de CDK4/6 es eficaz en el tratamiento de los tumores ER positivos, la resistencia *de novo* y adquirida a dichos tratamientos constituye un problema que es necesario abordar para poder obtener respuestas clínicas duraderas. Para entender los mecanismos moleculares involucrados en la generación de resistencia a los distintos tratamientos que se utilizan actualmente, es necesario contar con modelos preclínicos que semejen lo que ocurre en la clínica. Partiendo de esta premisa, utilizamos dos líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y MCF-7, ampliamente utilizadas en la literatura, para generar variantes resistentes a tamoxifeno y a palbociclib por presión selectiva con estas drogas por un período de tiempo prolongado, aumentando gradualmente la dosis utilizada. Además, y debido a que el palbociclib se utiliza generalmente para el tratamiento de los pacientes que recaen al tratamiento hormonal, decidimos generar nuevas variantes que simularan esta secuencia terapéutica. Es así como partiendo de las variantes resistentes a tamoxifeno, y por tratamiento constante con palbociclib, obtuvimos las variantes doble resistentes. Estos nuevos modelos son una herramienta para poder evaluar si los mecanismos de resistencia asociados al tratamiento con palbociclib son independientes de un tratamiento previo con tamoxifeno. La originalidad de nuestro abordaje reside en que en la literatura hay muy pocos trabajos que evalúan esta situación de doble resistencia a inhibidores endócrinos y de CDK4/6. Un ejemplo es el trabajo de (Pancholi et al. 2020), donde se estudia la resistencia a palbociclib, pero en un contexto de resistencia hormonal inducida por deprivación de estrógenos prolongada (LTED). Sin embargo, la mayoría de los trabajos estudian el desarrollo de resistencia a dichas drogas de forma individual. Algunos ejemplos son los trabajos que estudian la resistencia a inhibidores hormonales como el tamoxifeno y el anastrozole (Zhou et al. 2012, Vilquin et al. 2013) o que generan resistencia mediante LTED (Miller et al. 2011). Otros trabajos estudian la resistencia a inhibidores de CDK4/6 como el palbociclib y el ribociclib pero no tienen en cuenta la resistencia a tamoxifeno en los modelos generados (Herrera-Abreu et al. 2016, Jansen et al. 2017, Ono et al. 2021).

Por otra parte, contar con estos modelos en dos líneas celulares diferentes es una ventaja ya que nos permite no solo validar los resultados obtenidos entre las líneas, sino contar con otra línea en caso de que algún ensayo no sea posible de ser realizado en una de ellas por las características de esa línea en particular.

- **Características morfológicas de las variantes resistentes.**

La morfología de las variantes resistentes se asemeja a la morfología poliédrica de las líneas T47D y MCF-7 *wild type*. Sin embargo, encontramos algunas diferencias cuando las cultivamos tanto en 2D como en 3D. En primer lugar, tanto las células T47D como las MCF-7 *wild type* logran formar una monocapa completa creciendo en 2D sobre placas de plástico y forman grupos de células de estructura regular. Sin embargo, las variantes resistentes difícilmente logran formar una monocapa completa y los grupos de células que forman son más irregulares y menos compactos. En particular observamos diferencias notables en la variante resistente a tamoxifeno MCF-7-TR y en la doble resistente MCF-7-TPR con respecto a la línea parental, donde vemos que las resistentes presentan mayor atipia celular, es decir, grupos de células pequeñas acompañadas de grupos de células visiblemente más grandes que las parentales. En el caso de las variantes resistentes a palbociclib T47D-PR y MCF-7-PR, presentan un tamaño celular ligeramente mayor a las líneas parentales respectivas. Además, las variantes doble resistentes T47D-TPR y MCF-7-TPR mostraron mayor irregularidad en el tamaño y forma celular, con grupos de células con morfología más ahusada, lo cual podría correlacionarse con la menor expresión de E-cadherina en estas variantes. Otra característica interesante de estos cultivos resistentes fue la presencia de células con fenotipo similar al senescente, es decir, células de gran tamaño y con citoplasma muy grande y expandido, observado principalmente en las variantes resistentes a palbociclib. Restaría evaluar en el futuro si estos tipos celulares se corresponden con células en senescencia o quiescencia, lo cual todavía no fue evaluado. La mayor proporción de este tipo celular con respecto a las líneas *wild type* podría deberse a distintas causas. Una de ellas podría ser un mecanismo de escape al tratamiento, es decir, estos tipos celulares no serían tan susceptibles a las drogas debido a su baja tasa de división celular, sobreviviendo al tratamiento de selección. Estas células podrían eventualmente revertir el proceso de senescencia y comenzar a dividirse nuevamente. Este mecanismo ya fue previamente reportado en líneas de cáncer de mama y de pulmón expuestas a distintos tratamientos que inducen senescencia (Achuthan et al. 2011, Yang et al. 2017). Por otra parte, se sabe también que el palbociclib es un agente que induce la senescencia celular, y que al retirar la droga este estado podría revertirse, como fue mostrado en células derivadas de glioma de pacientes (Morris-Hanon et al. 2019).

Al evaluar la morfología de las variantes T47D creciendo en cultivos 3D sobre Geltrex, observamos diferencias en el agrupamiento celular de las variantes resistentes con respecto a la línea T47D-*wt*. Esta línea forma cúmulos compactos, de forma esférica, algunos de los cuales presentan una luz en su interior, similar a un “ducto”, lo cual fue observado mediante un barrido de imágenes sucesivas utilizando microscopía confocal. Por el contrario, en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR las esferas fueron de tamaño más pequeño, y en la resistente a palbociclib T47D-PR y doble resistente T47D-TPR observamos estructuras desorganizadas, algunas con forma de racimo de uvas, fenotipo asociado a la

pérdida de uniones célula-célula en líneas tumorales de mama (Kenny et al. 2007, Han et al. 2010).

En base a este resultado decidimos evaluar la expresión y localización de E-cadherina, proteína de adhesión célula-célula. Como era de esperar, encontramos una marcada localización en la membrana en las líneas parentales T47D y MCF-7, mientras que las variantes resistentes presentan una disminución en la expresión de esta proteína, principalmente la variante resistente a palbociclib MCF-7-PR. Además, llamativamente encontramos que la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presenta una mayor localización nuclear de esta proteína. La expresión nuclear aberrante de E-cadherina podría estar asociada a mayor tumorigenicidad e invasividad, como fue demostrado en cáncer colorrectal y tumores de la glándula pituitaria (Elston et al. 2009, Zhao et al. 2019).

Un análisis preliminar de los datos obtenidos a partir de la secuenciación de exoma completo que realizamos en las líneas T47D muestra que las variantes resistentes, sobre todo la doble resistente T47D-TPR, presentan numerosas mutaciones nuevas en proteínas relacionadas a adhesión celular y matriz extracelular, tales como las mucinas y el colágeno. Debemos validar estos resultados en el futuro para ahondar en el resultado funcional de estas alteraciones.

En términos generales podemos decir que la resistencia a tamoxifeno y a palbociclib coexiste con un fenotipo celular más desorganizado, con pérdida de adhesión célula-célula, lo cual podría influenciar en el comportamiento invasivo de las células.

- **Proliferación *in vitro* y crecimiento *in vivo* de las variantes resistentes.**

El tiempo elegido de selección de las variantes resistentes (12 meses para las resistentes simples y 24 meses para las doble resistentes) se basó en diversos trabajos de la literatura, en nuestro trabajo previo de tesina de licenciatura (M. Jimena Rodriguez, FCEN, UBA, 2015) y en la observación del crecimiento de los cultivos. Al final del proceso de selección las variantes resistentes no recuperaron la tasa de división de la línea T47D-*wt*, sin embargo, decidimos finalizar el proceso de selección y evitar que el número de pasajes de cada cultivo siguiera aumentando, ya que esto conllevaría un mayor riesgo de daño o alteración celular. Esta menor tasa de división celular podría deberse a un aumento en la proporción de células senescentes o quiescentes, como comentamos en la sección anterior, o incluso, como es el caso de la resistente a tamoxifeno T47D-TR, a un aumento en la proporción de células con características *stem* en estos cultivos.

En el caso de la variante doble resistente T47D-TPR, no logramos obtener tumores que crezcan exponencialmente en tamaño al inocularlas *in vivo*. Esto fue repetido dos veces

en presencia de pellet de estradiol y una vez en ausencia del mismo, y en ambos casos los tumores se establecieron, logrando un tamaño pequeño, pero no crecieron en un período de tiempo de aproximadamente dos meses. Restaría evaluar qué ocurre si dejamos estos tumores durante más tiempo en los ratones o si una vez establecido el tumor obtenemos una pequeña porción de este y lo trasplantamos en otro ratón, método que se utiliza de rutina para el mantenimiento de PDXs o de tumores murinos.

Mediante los ensayos realizados *in vivo* con y sin pellet de estradiol, demostramos que las líneas únicamente lograron establecer tumores y crecer en presencia de estradiol, corroborando que todas las variantes mantienen su dependencia hormonal, al menos para el establecimiento inicial de los tumores. Sin embargo, algo a tener en cuenta es que algunos autores refieren que la señalización a través de estradiol puede favorecer el crecimiento de tumores ER negativos u hormono-independientes actuando no a nivel de las células tumorales, sino sobre el sistema inmune, aumentando la inmunosupresión, y contribuyendo a la iniciación tumoral, angiogénesis y progresión tumoral (Gupta et al. 2006, Svoronos et al. 2017). Este podría ser el caso de las variantes resistentes, principalmente las resistentes a tamoxifeno T47D-TR y doble resistentes T47D-TPR, donde vimos que la expresión de ER se encuentra drásticamente disminuida con respecto a la línea parental.

Cuando evaluamos la sensibilidad de las variantes generadas a los inhibidores con los cuales fueron seleccionadas, la resistente a tamoxifeno T47D-TR y doble resistente T47D-TPR no respondieron al tratamiento con este inhibidor, como era esperado. Sin embargo, un hecho llamativo fue que en el caso de la resistente a palbociclib T47D-PR y doble resistente T47D-TPR, a pesar de haber sido seleccionadas en presencia de la droga por 12 meses, aún mantienen un porcentaje de sensibilidad al palbociclib. De todas maneras, cuando comparamos este porcentaje con la línea T47D-*wt*, vemos que la inhibición en el caso de las resistentes es significativamente menor. Este hecho podría deberse a que el tiempo de selección no haya sido suficiente o a condiciones intrínsecas de la línea celular, como ya fue observado en la bibliografía al seleccionar T47D y MCF-7 con palbociclib (Ono et al. 2021). La sensibilidad en el caso de las líneas MCF-7 resistentes será evaluada próximamente.

Evaluamos además la sensibilidad a otros inhibidores análogos a los utilizados para seleccionar las líneas. Evaluamos la respuesta a fulvestrant (SERD) en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR y doble resistente T47D-TPR, y mostramos que también son resistentes a este inhibidor *in vitro*. Estas variantes presentan además una drástica disminución en la expresión del ER. Sin embargo, cuando evaluamos estos tratamientos *in vivo*, los tumores T47D-TR fueron resistentes a tamoxifeno, pero sensibles al fulvestrant. Este resultado, si bien se contradice con lo observado *in vitro*, se correlaciona con lo que comúnmente ocurre en la clínica, donde muchas veces los pacientes que recaen a tamoxifeno aún responden a otros inhibidores hormonales como al fulvestrant o inhibidores de aromataasa, que son los utilizados en una segunda línea de tratamiento (Johnston et al. 2003, Wang et al. 2009). Debemos tener en cuenta que, si bien las respuestas *in vitro* en general se

correlacionan con lo observado *in vivo*, en este último caso la respuesta al tratamiento podría estar modificada por las dosis y tiempos de administración y la presencia del microambiente tumoral, entre otros factores. Por otra parte, al analizar en cultivo celular la expresión del ER luego de 18 días de interrupción en la administración de tamoxifeno, vimos que la misma no se restituye, con lo que concluimos que esta disminución es estable y no depende de la presencia constante de la droga en el medio de cultivo.

En el caso de la variante resistente a palbociclib y doble resistente, evaluamos la respuesta a otros inhibidores de CDK4/6, el ribociclib y el abemaciclib, resultando parcialmente resistentes a estos inhibidores. La diferencia entre estos tres inhibidores se basa en su afinidad para inhibir CDK4, CDK6 y otras CDKs como CDK2 y CDK1. Palbociclib presenta igual afinidad por CDK4 y CDK6, ribociclib presenta mayor afinidad por CDK4 y abemaciclib es el único capaz de inhibir además otras CDKs. En este caso, si comparamos los porcentajes de inhibición a una misma dosis de las tres drogas, todas las variantes responden más a palbociclib y a abemaciclib que a ribociclib, lo cual podría explicarse por una mayor dependencia de CDK6, sobre todo en la variante resistente a palbociclib T47D-PR, donde encontramos una mayor expresión de esta quinasa. Además, abemaciclib fue el más eficiente inhibiendo tanto la fosforilación de Rb como de S6.

Finalmente, evaluamos la sensibilidad cruzada a palbociclib en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR, y vimos que, si bien responde, la inhibición es significativamente menor que en la línea *wild type*. De forma contraria, cuando evaluamos la sensibilidad a tamoxifeno en la variante resistente a palbociclib, vimos que también la inhibición es menor que en la línea parental, lo cual podría deberse a la menor expresión del ER que presenta esta variante resistente, lo cual ya fue reportado en células T47D y MCF-7 sometidas al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 (Yang et al. 2017, Ono et al. 2021). Esta expresión disminuida del ER tampoco se reestablece al dejar de administrar palbociclib por 18 días. Estos resultados sugieren que la continuación del tratamiento hormonal podría no ser del todo eficaz en algunos contextos de resistencia adquirida al inhibidor de CDK4/6, por ejemplo, donde exista pérdida de la señalización a través de ER.

- **Análisis de la presencia de células madre tumorales en las variantes resistentes.**

Como comentamos en la sección anterior, las variantes resistentes mostraron una menor tasa de proliferación. Evaluamos entonces si el proceso de selección con tamoxifeno y palbociclib fue capaz de enriquecer los cultivos en células con características de células madre tumorales o *stem cells*, lo cual fue reportado previamente en células MCF-7 expuestas a estos tratamientos (Leung et al. 2017, Chen et al. 2019).

Realizamos ensayos de formación de mamíferas como método para evaluar la presencia de este tipo de células, y encontramos que todas las variantes fueron capaces de formar esferas en suspensión. Sin embargo, las estructuras formadas por las variantes resistentes fueron desorganizadas e irregulares, a diferencia de la morfología bien compacta y regular de las esferas formadas por la línea T47D-*wt*. Teniendo en cuenta que para la formación de mamíferas es necesaria la presencia de E-cadherina para mantener la cohesión en la esfera (Manuel Iglesias et al. 2013), es esperable observar esas alteraciones en las variantes resistentes, que presentan alteraciones en la expresión y localización de E-cadherina.

Mediante ensayos de dilución límite pudimos cuantificar la cantidad de esferas formadas por cada variante, siendo la resistente a tamoxifeno T47D-TR la única que presentó mayor frecuencia en la formación de esferas con respecto a la línea parental. Este resultado se correlaciona además con una mayor expresión en esta variante de OCT4 y NANOG, dos marcadores que se encuentran comúnmente sobreexpresados en células madre tumorales. Por el contrario, encontramos una disminución en SOX2 en todas las variantes resistentes, sobre lo cual debemos seguir indagando ya que en principio se contraponen con lo esperado. No observamos diferencias en la cantidad de esferas formadas por las variantes T47D-PR y T47D-TPR con respecto a la línea parental. Si bien este resultado sugiere que el tratamiento con palbociclib no afectaría la proporción de células madre tumorales o incluso podría revertir el aumento observado luego del tratamiento con tamoxifeno, como sería en el caso de la variante doble resistente, es necesario realizar más ensayos para confirmar esta afirmación. Existe evidencia de que el tratamiento prolongado con palbociclib podría aumentar la población de células madre tumorales en MCF-7 (Chen et al. 2019). Además, en este trabajo encontramos un aumento en la expresión de la proteína de resistencia a multidroga (BCRP) en la variante resistente a palbociclib, la cual estaría asociada al fenotipo *stem* en células madre de distintos orígenes (Zhou et al. 2001, Natarajan et al. 2012). Una limitante para este estudio es el método utilizado, ya que los ensayos de mamíferas requieren de la presencia celular de E-cadherina, y debemos tener en cuenta que sobre todo la variante T47D-TPR tiene disminuida la expresión de esta proteína. Trabajos de la literatura proponen que existirían distintos tipos de células madre tumorales, con características más epiteliales o más mesenquimales (Brooks et al. 2015, Kong et al. 2020). En nuestro caso podríamos especular que las células madre presentes en la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presentan características más epiteliales mientras que las células madre presentes en la variante doble resistente T47D-TPR podrían presentar características más mesenquimales y por eso no puedan ser detectadas mediante este ensayo. Es por esto que no descartamos a futuro evaluar la presencia de células madre mediante otros métodos, como marcación por citometría de flujo, que no dependan de la expresión de E-cadherina como el ensayo de formación de mamíferas, así como también realizar estos ensayos en las variantes MCF-7.

- **Capacidad migratoria e invasiva de las variantes resistentes.**

No fue posible realizar ensayos *in vitro* de migración e invasión utilizando las variantes T47D, posiblemente debido a que esta línea en particular no presenta características muy migratorias ni invasivas. Por lo tanto, utilizamos las variantes MCF-7 para este fin. Encontramos que tanto la resistente a tamoxifeno MCF-7-TR como la resistente a palbociclib MCF-7-PR presentan una mayor capacidad migratoria que la línea parental, lo cual podría estar asociado a la disminución en la expresión de E-cadherina que mencionamos previamente. Llamativamente no encontramos diferencias significativas en la migración de la variante MCF-7-TPR con respecto a la línea *wild type*, siendo esta resistente la que presenta mayor irregularidad en el tamaño celular, cúmulos menos compactos, con grupos de células de morfología más ahusada. Algo que no podemos descartar es que las células grandes, con morfología tipo senescente, puedan tener menor movilidad y posibilidad de atravesar el *transwell*, con lo cual no las estaríamos considerando al hacer este análisis.

Al analizar los tumores generados *in vivo* por inoculación de las líneas T47D, observamos que todas, incluso la línea parental, forman tumores que invaden los tejidos circundantes al tejido mamario, tales como el tejido adiposo, muscular y los vasos. Sin embargo, ninguno de estos tumores fue capaz de generar grandes focos metastásicos en pulmón, que fue el órgano evaluado, al menos en las condiciones utilizadas para estos ensayos. Observamos en los pulmones de los ratones pequeños focos metastásicos de entre 2 y 40 células, pero no vimos diferencias significativas en el tamaño o cantidad de focos entre las distintas variantes resistentes. Si bien no está reportado en la literatura que la línea T47D pueda generar focos metastásicos, debemos considerar algunos factores. Por un lado, nuestra línea T47D-*wt* ha sido sometida al mismo número de pasajes celulares que las variantes resistentes a lo largo del proceso de selección para poder hacer el análisis comparativo, por lo cual esto podría haber alterado su fenotipo y aumentar su capacidad invasiva; sin embargo, al inocular como control células T47D-*wt* de pasaje bajo, observamos el mismo fenotipo, descartando que esto se deba al número de pasajes. Por otro lado, esta es una línea celular derivada de un infiltrado pleural de una paciente con un carcinoma ductal avanzado (<https://www.atcc.org/products/htb-133>), lo que nos lleva a pensar que una vez que estas células logran entrar en circulación, serían capaces de crecer en las estructuras del parénquima pulmonar como se ve en los focos metastásicos pulmonares de la línea T47D-*wt*, que generalmente se encuentran asociados a la pleura. Sería interesante utilizar las líneas MCF-7 para evaluar la generación de metástasis en este modelo, ya que vimos que estas variantes presentan una mayor capacidad migratoria *in vitro*.

En términos generales podemos decir que la resistencia a tamoxifeno y a palbociclib coexiste con una menor tasa de proliferación celular y una menor sensibilidad cruzada a cada agente. Esta menor proliferación podría significar una forma de escape al tratamiento, a través del enriquecimiento en células con características *stem* o senescentes. La resistencia a tamoxifeno y a palbociclib podría asociarse también a una mayor capacidad migratoria.

- **Alteraciones en la expresión de proteínas del ciclo celular en las variantes resistentes.**

Encontramos que la variante resistente a palbociclib T47D-PR presenta una mayor proporción de células en G2/M con respecto a la línea parental. Palbociclib es un inhibidor que arresta a las células en fase G0/G1 (Liu et al. 2018). En este caso, las células resistentes habrían logrado evitar el arresto en G0/G1 y avanzar en el ciclo, sin embargo, algún mecanismo que por el momento desconocemos haría que las células permanezcan más tiempo en G2/M. Dado que la medición de ciclo celular por citometría no permite diferenciar las células que se encuentran en G2 de las que se encuentran en mitosis, decidimos evaluar si estas células presentaban aberraciones en las mitosis, provocando que las mismas no logren dividirse correctamente. Mediante inmunofluorescencia con DAPI pudimos visualizar las mitosis en esta variante y observamos que la mayoría de ellas son normales, por lo cual especulamos que en este caso las células no estarían superando eficientemente el *checkpoint* de G2 por alguna otra alteración particular. Esto a su vez podría correlacionarse con el mayor tamaño de estas células, las cuales continuarían creciendo, pero verían demorada la división celular. Un análisis preliminar de la secuenciación de exoma completo en esta variante mostró que presenta una mutación patogénica en el gen que codifica para γ -tubulina, proteína asociada al pasaje G2-M. En el futuro debemos evaluar si esta mutación podría estar afectando la proporción de células en esta fase del ciclo. Además, esta variante presentó un aumento en la expresión de CDK1, quinasa que regula a la ciclina B1, la cual se expresa principalmente en la fase G2/M.

Las variantes resistentes a palbociclib T47D-PR y MCF-7-PR mostraron además un aumento en CDK4, CDK6 y ciclina D1. En el caso de la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR y doble resistente T47D-TPR, observamos un aumento en la expresión de ciclina E2. La sobreexpresión de ciclina E fue previamente reportada como mecanismo de resistencia a tamoxifeno y palbociclib en distintos modelos de cáncer de mama (Caldon et al. 2012, Herrera-Abreu et al. 2016, Jansen et al. 2017, Pandey et al. 2020), ya que las células sobreexpresarían esta ciclina permitiendo la continuidad del ciclo incluso en presencia del inhibidor hormonal o de CDK4/6. A su vez, el aumento compensatorio de otras ciclinas y CDKs permitiría la formación de nuevos complejos, como por ejemplo complejos ciclina D1/CDK2 (Jahn et al. 2013), evadiendo así la inhibición de CDK4/6. El análisis de mutaciones realizado a partir de los datos de la secuenciación de exoma completo que realizamos no arrojó como resultado nuevas mutaciones en CDKs y ciclinas entre las variantes resistentes y la *wild type* que puedan explicar las diferencias. Resta evaluar mediante análisis de variación de número de copias (CNV) si este aumento en la cantidad de proteína se debe a amplificaciones de estos genes o a otro proceso epigenético o post-transcripcional.

Por otra parte, otro de los mecanismos asociados a la resistencia a palbociclib es la desregulación de p16, inhibidor endógeno del ciclo celular. En este caso esto no pudo ser evaluado debido a que las líneas T47D y MCF-7, al igual que muchas otras líneas celulares,

no expresan esta proteína, ya sea por silenciamiento epigenético (Witcher et al. 2009) o deleción homocigota del gen (Todd et al. 2017), respectivamente.

- **Alteraciones en la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR.**

Como se comentó en la Introducción de esta tesis, la vía de PI3K/AKT/mTOR es una vía frecuentemente alterada en cáncer de mama, sobre todo en los tumores que recaen a la terapia hormonal. Es importante recordar que tanto la línea T47D como la línea MCF-7 presentan las mutaciones activantes más frecuentes en el gen de PI3K subunidad catalítica α (*PIK3CA*), H1047R en T47D y E545K en MCF-7, y tienen esta vía basalmente activa. Aun así, las variantes resistentes presentan mayor activación basal (sin tratamiento) de proteínas de la vía en comparación con la activación basal de las líneas *wild type*. Sorpresivamente, vimos que la variante resistente a tamoxifeno T47D-TR presenta un aumento en la activación de AKT (Ser473 y Thr308) pero no de S6 (proteína *downstream* AKT). Por el contrario, vimos que la variante resistente a palbociclib T47D-PR presenta un aumento en pS6 (Ser240/244 y Ser235/236) pero no en pAKT. Esto último también fue observado en la variante resistente a palbociclib MCF-7-PR. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que S6 se active por otra vía de señalización paralela a la vía de PI3K/AKT/mTOR, como ya fue reportado en el caso de las vías de ERK y PKC en células de cáncer de mama, cérvix y del sistema inmune (Parker et al. 1985, Valovka et al. 2003, Roux et al. 2007, Salmond et al. 2009), o a la presencia de alteraciones en la vía de PI3K/AKT/mTOR pero *downstream* AKT. Otro mecanismo que podría estar ocurriendo, como mencionamos en la Introducción, es una regulación negativa de S6K sobre IRS-1 y consecuentemente una menor activación de PI3K, por lo cual no veríamos una mayor activación de AKT en este caso (Shah et al. 2006, Metz et al. 2011, Oleksiewicz et al. 2011).

Un análisis preliminar de la secuenciación de exoma completo mostró que las variantes T47D resistentes, a pesar de mostrar una mayor activación de AKT o S6, no presentan nuevas mutaciones activantes en proteínas clave de esta vía de señalización, sugiriendo que esta sobreactivación podría provenir de otras vías de señalización que interactúen con la vía de PI3K/AKT/mTOR, u otro tipo de modificación ya sea epigenética, post-transcripcional u otra. A futuro evaluaremos la posibilidad de realizar algún análisis proteómico comparativo entre las distintas variantes.

Para evaluar si la sobreactivación que observamos de estas proteínas es estable (irreversible) o se debe a la presencia de las drogas de selección (reversible), mantuvimos las variantes resistentes en ausencia de las drogas por 13-18 días y volvimos a evaluar la fosforilación de AKT y S6. Encontramos que la activación de estas proteínas se mantiene con respecto al tiempo inicial evaluado, sugiriendo que esta sobreactivación es estable y no depende de forma directa de la presencia de las drogas en el medio de cultivo.

Por otra parte, decidimos evaluar el efecto cruzado de palbociclib sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR, en particular sobre la activación de AKT y S6. Algunos trabajos sostienen que el complejo ciclina D1-CKD4/6 activo conduciría a un **aumento** en pS6 mediante inhibición del complejo TSC1/TSC2 en células de cáncer de mama y osteosarcoma (Zacharek et al. 2005, Romero-Pozuelo et al. 2020). De esta forma, el tratamiento con palbociclib inhibiría la activación de S6. Por el contrario, otros trabajos muestran que la fosforilación de Rb inhibiría directamente al complejo mTORC2, **reduciendo** así la activación de AKT y S6 (Zhang et al. 2016), de forma que el agregado de palbociclib lograría activar S6. En nuestro sistema, en un primer ensayo observamos que el palbociclib no fue capaz de inhibir la vía de PI3K/AKT/mTOR luego de 30 horas de tratamiento en ninguna de las variantes T47D resistentes ni en los PDXs evaluados.

Para profundizar en este estudio, evaluamos el efecto de esta droga en tres modelos diferentes. Cuando tratamos las líneas MCF-7-*wt*, T47D-*wt* y T47D-PR con palbociclib, la fosforilación de S6 parece disminuir a tiempos cortos, pero luego de 48 horas esta fosforilación se recupera y tiende a aumentar. En T47D-*wt* el abemaciclib fue capaz de inhibir de forma efectiva la fosforilación de S6, al igual que fue demostrado en el trabajo de (Litchfield et al. 2020) en líneas celulares de cáncer de mama y otros cánceres.

Por último, evaluamos el efecto de palbociclib en las líneas celulares MDA-MB-231 (línea triple negativa y sin mutaciones en *PIK3CA*) y JIMT-1 (línea que presenta sobreexpresión de HER-2 y mutación C420R en *PIK3CA*). En ambos casos, si bien palbociclib logró inhibir parcialmente la fosforilación de Rb, no fue capaz de inhibir eficientemente ni pAKT ni pS6 luego de 96 horas de tratamiento. Además, algo interesante a destacar es que, a pesar de la ausencia de mutaciones en *PIK3CA* en la línea MDA-MB-231, y su baja activación de AKT en comparación con la línea JIMT-1, la línea triple negativa presenta una activación basal alta de S6.

Si bien resta continuar con el estudio de la interacción de la vía de PI3K/AKT/mTOR y el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb, **nuestros resultados reforzarían la idea de que una combinación de inhibidores de CDK4/6 con inhibidores de mTOR sería efectiva y necesaria para suprimir más eficientemente la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y evitar o retrasar un posible escape al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 a través de la reactivación de esta vía *downstream* mTOR.**

- **Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR y tratamientos combinados.**

Como mencionamos en la Introducción, alteraciones en las vías de PI3K/AKT/mTOR y ciclina D1/CDK4/6/Rb están relacionadas mayormente con la progresión del cáncer de mama luminal (Turner et al. 2019, Anderson et al. 2020). Por el momento se encuentra aprobado en la clínica el uso de dos inhibidores de la vía de

PI3K/AKT/mTOR, everolimus (inhibidor de mTORC1) y alpelisib (inhibidor PI3K α), para su uso en pacientes que recaen al tratamiento con inhibidores de CDK4/6 y de estadio avanzado/metastásico. A diferencia del everolimus, donde no hay un marcador validado, para el uso de alpelisib se utiliza como criterio de selección la presencia de mutaciones en el gen de *PIK3CA* en el tejido tumoral o en DNA circulante.

Evaluamos la sensibilidad de las variantes resistentes a distintos inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR. Encontramos una mayor respuesta a rapamicina (análogo de everolimus) en las variantes resistentes a tamoxifeno T47D-TR y a palbociclib T47D-PR con respecto a la línea *wild type*, incluso a dosis más bajas. En particular, la variante T47D-PR, además presentó una menor respuesta a alpelisib, sugiriendo que al tener un aumento en pS6 y no en pAKT, sería más efectiva una inhibición más abajo en la cascada de señalización. La mayor sensibilidad de las variantes resistentes a la rapamicina no se reprodujo con el uso de everolimus. Esto podría deberse a varios motivos, uno de los cuales podría ser que el everolimus es más potente que la rapamicina inhibiendo la proliferación en la línea T47D-*wt* incluso a bajas dosis, por lo que no se evidencian diferencias con respecto a las variantes resistentes. Por otro lado, un trabajo de la literatura postula que el everolimus, si bien es un inhibidor específico del complejo mTORC1, tendría un mayor efecto sobre el complejo mTORC2 (Klawitter et al. 2015), y esto podría estar implicado en las respuestas observadas. La rapamicina también sería capaz de inhibir el complejo mTORC2 pero a altas dosis o a tiempos largos de tratamiento (Sarbasov et al. 2006, Mukhopadhyay et al. 2016). Esta cuestión se discute en la literatura ya que la respuesta varía según la línea celular utilizada, los tiempos y las concentraciones de la droga. En el caso de nuestro trabajo, las diferencias significativas entre líneas fueron observadas a dosis bajas de rapamicina (entre 1 y 50 nM) y a tiempo máximo de 7 días de tratamiento. Sería interesante analizar qué ocurre con estas drogas en las variantes MCF-7 para poder comparar estos resultados o incluso evaluar la actividad de mTORC1 y mTORC2 basal entre las variantes y en presencia de los inhibidores.

No observamos mayor inhibición de la proliferación utilizando AZD2014, un inhibidor dual mTORC1/mTORC2. El ensayo clínico MANTA (Schmid et al. 2019), realizado en mujeres postmenopáusicas y con cáncer de mama avanzado o metastásico, muestra también que la utilización de AZD2014 en combinación con letrozole no mejora la respuesta obtenida con letrozole solo, mientras que la combinación de everolimus y letrozole muestra un aumento en la supervivencia libre de progresión, como ya había sido observado en el ensayo BOLERO-2 (Baselga et al. 2012). Sería interesante seguir indagando y evaluando el rol diferencial de los complejos mTORC1 y mTORC2, y el efecto de inhibir cada uno o ambos de forma simultánea, ya que, a diferencia de algunos trabajos en células de cáncer de mama (Guichard et al. 2015, Michaloglou et al. 2018), nuestros resultados y los del ensayo clínico citado indican que la doble inhibición no parece reportar una mejora en la respuesta inhibitoria con respecto a la inhibición del complejo mTORC1 solo. Además, debemos tener en cuenta que una inhibición completa de ambos complejos mTORC representaría un nivel de toxicidad mayor en los pacientes.

Por otro lado, algo interesante a mencionar, es que en particular la variante doble resistente T47D-TPR mostró menor inhibición con everolimus que la línea parental, y no mostró diferencias en la inhibición con rapamicina o ADZ2014. Sin embargo, cuando evaluamos por western blot el efecto de los tratamientos sobre la vía de PI3K/AKT/mTOR y proteínas del ciclo celular, vemos que AZD2014, el inhibidor dual mTORC1/2, tiene un mayor efecto inhibiendo Rb y ciclinas que los inhibidores de mTORC1. La línea T47D-TPR además había mostrado un aumento en la expresión de PKC α , proteína asociada a la resistencia a tamoxifeno en líneas celulares y muestras humanas (Lin et al. 2006, Assender et al. 2007, Li et al. 2012), y que estaría regulada positivamente por el complejo mTORC2 (Guertin et al. 2006, Ikenoue et al. 2008, Singh et al. 2017). Es posible que en este caso sea más efectivo inhibir ambos complejos o incluso inhibir en paralelo la vía de PI3K/AKT/mTOR y la activación de PKC α con un inhibidor selectivo como podría ser el Go6976, lo cual será evaluado en el futuro.

Los inhibidores de PI3K/AKT/mTOR se utilizan por el momento en combinación con terapia hormonal, debido a los beneficios clínicos reportados en los ensayos BOLERO-2 y SOLAR-1. La combinación de inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR e inhibidores de CDK4/6 se encuentra todavía en estudio tanto en modelos preclínicos (Herrera-Abreu et al. 2016, Michaloglou et al. 2018, O'Brien et al. 2020) como en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de mama avanzado (NCT02389842) o cáncer de pulmón y otros (NCT03065062).

En nuestro trabajo, cuando evaluamos la combinación de rapamicina con palbociclib en las variantes T47D resistentes, encontramos una mayor inhibición de la proliferación *in vitro* con respecto a la inhibición de ambas drogas de forma individual. Esto se correlacionó con una mayor inhibición tanto en la fosforilación de Rb como en la expresión de distintas proteínas del ciclo celular con los inhibidores de mTOR combinados con palbociclib. Por otra parte, cuando analizamos la respuesta *in vivo* en ratones tratados con rapamicina y palbociclib, observamos que solo en el caso de los tumores resistentes a tamoxifeno T47D-TR el tratamiento combinado logró inhibir el crecimiento tumoral de forma significativamente mayor con respecto a los tratamientos individuales. En el caso del tratamiento de la variante resistente a palbociclib T47D-PR *in vivo*, vemos que, si bien la combinación de rapamicina con palbociclib no mejora el efecto sobre el crecimiento tumoral respecto a rapamicina sola, cuando analizamos la activación de Rb y S6 en los tejidos tratados, observamos una mayor inhibición de ambas con el tratamiento combinado con respecto a los tratamientos simples. Debemos evaluar en el futuro dosis menores de rapamicina en este modelo, lo cual nos permitiría tener un margen mayor sobre la inhibición del crecimiento tumoral para poder evaluar el tratamiento combinado.

Es interesante mencionar que tanto la rapamicina como el everolimus, a diferencia del alpelisib, son capaces de inhibir la proliferación aún a concentraciones muy bajas, del orden nanomolar, lo cual fue observado tanto en las líneas celulares como en los PDXs. Sería interesante entonces evaluar a futuro esquemas de tratamiento combinado

rapamicina/everolimus con palbociclib *in vivo*, pero reduciendo las dosis de los inhibidores de mTORC1, incluso por un período más prolongado para evaluar mejor su efecto. Esta reducción en las dosis podría disminuir los efectos adversos observados en pacientes frente al tratamiento con esta droga, sin perjuicio de su efecto antitumoral.

En este trabajo mostramos entonces que el palbociclib en combinación con el inhibidor de mTORC1 rapamicina muestra una mayor inhibición de la proliferación con respecto a cada droga utilizada de forma individual, lo que se correlaciona con un efecto inhibitorio mayor sobre las proteínas del ciclo celular y una completa inhibición de S6 en todas las variantes evaluadas.

Si bien en este trabajo medimos la fosforilación de S6 como un marcador de activación de la vía de PI3K a través de mTOR, debemos tener en cuenta que los complejos formados por mTOR regulan una gran cantidad de procesos celulares además de la traducción de proteínas y el crecimiento celular, por lo tanto, al inhibirlo no solo estaremos inhibiendo a nivel de la fosforilación de S6 sino también otros blancos de estos complejos, que, si bien no fueron medidos en este trabajo, sería interesante analizar en el futuro. Otros procesos que cobran vital importancia en la proliferación, sobrevida y escape tumoral y que son regulados a través de mTOR son la autofagia, la apoptosis, el metabolismo celular y la organización del citoesqueleto, entre otros (Corradetti et al. 2006, Saxton et al. 2017). Por ejemplo, un aspecto que no hemos podido explorar en esta tesis pero que nos parece de gran interés para abordar en el futuro es el efecto de los inhibidores de mTORC1 sobre los mecanismos de *stemness*, senescencia y transición epitelio-mesenquimal. Algunos trabajos resaltan el rol de mTOR en estos procesos, como lo reportado en células MCF-7 (Chen et al. 2019), en fibroblastos embrionarios (Wang et al. 2017) y en células madre de glioma (Morris-Hanon et al. 2019). Así como señalan algunos autores (Zhang et al. 2013, Gawrzak et al. 2018, Hanker et al. 2020) hipotetizamos que el bloqueo conjunto con inhibidores de CDK4/6 y mTOR podría mantener el efecto antitumoral a largo plazo al interferir también con esos mecanismos de escape, evitando o retrasando así el desarrollo de recurrencias.

Además, a nivel de mTOR convergen varias vías clave, no sólo la de PI3K/AKT sino también las vías de MAPK/ERK, PKC, entre otras, así como también existen distintos puntos de interacción entre este complejo y el eje ciclina D1/CDK4/6/Rb. Un aspecto que sería interesante evaluar en el futuro es el efecto ejercido por mTOR sobre la fosforilación de Rb, proceso aún no estudiado en profundidad. Algunos trabajos de la literatura sugieren que mTOR podría estar activando este eje de forma directa a nivel de Rb o del complejo ciclina D1/CDK4/6, lo cual se condice con los resultados de este trabajo, donde vimos que el tratamiento con AZD2014 en líneas celulares y everolimus en PDXs conduce a una disminución en la fosforilación de Rb. Profundizar en el estudio de la regulación cruzada entre las vías de mTOR y ciclina D1/CDK4/6/Rb es de vital importancia para el diseño de terapias combinadas dirigidas para prevenir o retrasar la resistencia tumoral.

En base a todo esto, consideramos que la inhibición a nivel de mTOR podría ser más efectiva que la inhibición a nivel de PI3K, e incluso potenciar su efecto al combinarla con

inhibidores de CDK4/6, lo cual permitiría reducir las dosis del inhibidor de mTOR, que por la cantidad de procesos en los cuales participa, suele presentar mayores efectos adversos que los inhibidores de CDK4/6.

- **Relevancia de la utilización de PDXs.**

Como mencionamos en la Introducción, si bien los modelos que desarrollamos y describimos a lo largo de esta tesis son herramientas útiles para estudiar los mecanismos de resistencia a tratamientos, es importante tener en cuenta que existe una brecha entre el estudio de una línea celular *in vitro*, aislada del contexto fisiológico real, y el estudio de la misma *in vivo*, donde las células crecerán formando un tumor en un contexto de matriz extracelular y microambiente más cercano a lo que ocurre en un organismo. Ese abordaje lo realizamos con los xenotransplantes de las variantes celulares resistentes, que verificamos mantienen la resistencia al ser inoculadas en ratones. Pero además para complementar este estudio, realizamos una colaboración con el Laboratorio de Terapéutica Experimental dirigido por la Dra. Violeta Serra en el Instituto de Oncología Vall D'Hebron (VHIO) (Barcelona, España) donde utilizamos modelos de xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX), obtenidos a partir de tumores que expresan ER, para poder analizar y validar algunos de los resultados obtenidos en nuestras variantes celulares resistentes.

Contamos con PDXs tanto sensibles como resistentes a tamoxifeno y a palbociclib. A partir de células aisladas obtenidas por disgregación de estos PDXs y sembradas sobre Matrigel, realizamos tratamientos con distintas combinaciones de inhibidores, incluyendo alpelisib, everolimus y sus combinaciones con palbociclib y fulvestrant. Estos ensayos *ex-vivo* son una buena herramienta para poder testear en paralelo una gran cantidad de tratamientos y combinaciones, lo cual no sería posible de realizar en ratones por la gran cantidad de animales y el tiempo que demandaría. De esta forma, se pueden elegir los tratamientos más efectivos *ex-vivo* y luego ser testeados en los ratones portadores de PDXs. Si bien no todas las drogas y combinaciones evaluadas en este trabajo habían sido testeadas previamente *in vivo* en el Laboratorio de Terapéutica Experimental, observamos que existe una muy buena correlación entre la respuesta observada *in vivo* y los resultados obtenidos en este trabajo *ex-vivo* con respecto a los tratamientos que sí fueron testeados previamente.

La mayoría de los PDXs evaluados respondieron a alpelisib (con excepción de dos), mientras que todos los PDXs respondieron a everolimus, incluso en dosis bajas, y la combinación con palbociclib mostró además una mayor inhibición tanto a nivel de pS6 como de pRb y otras proteínas del ciclo celular.

Cabe destacar que solo cuatro de los PDXs analizados presentaron mutaciones en el gen *PIK3CA*. Los dos PDXs resistentes a alpelisib presentaron *PIK3CA-wt*, mientras que independientemente de la presencia de mutaciones en *PIK3CA* u otras alteraciones *downstream*, todos los PDXs respondieron al inhibidor de mTORC1. Esto destaca el hecho de que se requieren más estudios sobre la importancia de utilizar otros marcadores de

activación de la vía además de la mutación en *PIK3CA*, ya que no siempre la presencia o ausencia de una mutación puntual determina la respuesta al tratamiento (Mukohara 2015). Como señalamos anteriormente, aproximadamente el 40% de los cánceres de mama presenta alguna alteración en *PIK3CA*. Incluso la probabilidad de encontrar mutaciones dobles en *PIK3CA* es aún mayor. Las mutaciones dobles de *PIK3CA* dan como resultado un aumento de la actividad de PI3K, de la señalización *downstream* y como consecuencia un incremento de la proliferación celular y del crecimiento tumoral (Vasan et al. 2019). Lo interesante es que las mutaciones dobles pueden incluso predecir mayor sensibilidad a los inhibidores selectivos en comparación con las mutaciones en un solo sitio. Todo esto destaca la relevancia de rastrear en paralelo las alteraciones genómicas y de expresión/activación para detectar la resistencia adquirida antes de la progresión clínica y “dirigir” así la estrategia terapéutica.

Por último, observamos que, al igual que habíamos señalado en las líneas celulares, el tratamiento con palbociclib no fue capaz de inhibir eficientemente la activación de S6, lo cual soporta la necesidad de combinar este tratamiento con un inhibidor de mTOR como rapamicina o everolimus.

Podemos concluir que el tratamiento con el inhibidor de mTORC1 everolimus fue efectivo en todos los PDXs analizados independientemente de la presencia de mutaciones en *PIK3CA* o *downstream*, y el mayor efecto fue observado combinándolo con palbociclib y fulvestrant, inhibiendo en paralelo proteínas del ciclo celular y la activación de Rb/S6.

- **Conclusiones finales**

En este trabajo generamos y caracterizamos modelos experimentales de resistencia adquirida a tamoxifeno y a palbociclib que son herramientas útiles para estudiar los mecanismos involucrados en la resistencia terapéutica y el papel de vías de señalización, en particular la vía de PI3K/AKT/mTOR, en este tipo de resistencia, tanto en cultivo celular como *in vivo*. Además, fue posible validar una parte de los resultados utilizando células provenientes de PDXs de cáncer de mama ER+, modelo experimental que se acerca más a la heterogeneidad tumoral observada en la clínica.

En base a lo discutido, podemos decir que la primera hipótesis planteada en nuestro trabajo no se cumple. Esta hipótesis planteaba que los mecanismos de resistencia adquiridos por células seleccionadas con tamoxifeno o palbociclib de forma individual coinciden con los mecanismos que se desencadenan si ambos inhibidores se administran de forma secuencial. En este trabajo vemos que los mecanismos de resistencia son variables y no necesariamente coinciden entre los distintos modelos utilizados, tanto líneas celulares como PDXs. Sin embargo, encontramos puntos en común, ya que tanto con la inhibición hormonal como con la inhibición de CDK4/6 se produce una desregulación a nivel del ciclo celular que conduce al aumento o disminución de proteínas involucradas en las diferentes etapas del ciclo, permitiendo un escape frente a la inhibición ejercida a nivel de ER o CDK4/6. Además,

estos mecanismos de resistencia a tamoxifeno y palbociclib se entrecruzan entre sí, generando una menor sensibilidad cruzada al otro inhibidor una vez que se desarrolla la resistencia a uno de ellos. La reactivación de la vía de PI3K/AKT/mTOR, así como de otras vías como la de PKC α , parece ser otro de los mecanismos de escape frente a estos tratamientos, y, debido a esto, todos los modelos evaluados respondieron al tratamiento con inhibidores de PI3K/AKT/mTOR.

Encontramos además que la inhibición de mTOR podría ser más efectiva que la inhibición de PI3K, tanto en los casos donde no haya mutaciones en *PIK3CA* ni en otros genes de esta vía, como en los casos donde existan alteraciones *downstream PIK3CA* que lleven a una sobreactivación de mTOR. Además, el tratamiento con inhibidores de mTOR en combinación con palbociclib sería más efectivo que los inhibidores individuales, tanto en un contexto de resistencia a tamoxifeno como a palbociclib. Esta combinación podría permitir reducir las dosis utilizadas, reduciendo así los efectos adversos y la toxicidad, e incluso hipotetizamos que podría retrasar el desarrollo de una nueva resistencia inhibiendo procesos celulares involucrados en los mecanismos de escape tumoral, como podrían ser los mecanismos de *stemness*, senescencia y transición epitelio-mesenquimal, lo cual será evaluado en el futuro.

La utilización en paralelo de distintos modelos experimentales nos permitió no solo proponer estrategias terapéuticas con más información preclínica, sino también aportar a la búsqueda de posibles marcadores predictivos de resistencia terapéutica en cáncer de mama.

APÉNDICE

- **MEDIO DE CULTIVO PARA LÍNEAS CELULARES T47D, MCF-7, MDA-MB-231 y JIMT-1.**

- ✓ 10% SFB (Natocor) en DMEM/F12 sin rojo fenol (Corning)
- ✓ 50 mg/l gentamicina
- ✓ 1 nM insulina (solo en el caso de T47D y MCF-7)

- **MEDIO DE CULTIVO PARA MAMOSFERAS**

- ✓ DMEM/F12
- ✓ B-27 1X
- ✓ 20 ng/ul EGF
- ✓ 20 ng/ul bFGF
- ✓ 0,1% metilcelulosa

- **MEDIO DE CULTIVO PARA ENSAYOS *EX-VIVO***

- ✓ 2% SFB charcolizado en DMEM/F12 sin rojo fenol
- ✓ 10 ug/ml inhibidor de ROCK
- ✓ 3 ng/ml EGF
- ✓ 5 ug/ml insulina
- ✓ 1 ug/ml hidrocortisona
- ✓ B-27 1X
- ✓ 30 ug/ml gentamicina
- ✓ 15 ng/ml fungizona

- **MEDIO PARA DIGESTIÓN DE PDXs**

- ✓ 5% BSA en DMEM/F12/HEPES 1%
- ✓ 1 mg/ml colagenasa
- ✓ 100 u/ml hialuronidasa
- ✓ 5 ug/ml insulina
- ✓ 50 ug/ml gentamicina

- **TRIPSINA-EDTA**

Tripsina 0,25% p/v + EDTA 0,02% p/v disuelto en PBS 1X.

- ***BUFFER* RIPA**

- ✓ 0,1 g SDS
- ✓ 0,87 g NaCl

- ✓ 0,5 g deoxicolato de sodio
 - ✓ 1 ml tritón X-100
 - ✓ 0,06 g EDTA
 - ✓ 10 ml solución Tris-Cl 500 mM pH=8
 - ✓ 0,0367 g ortovanadato de sodio
 - ✓ Volumen final 100 ml de agua destilada.
- **TBS 10X**
NaCl 87,66 g + Tris 24,22 en 1 litro de agua destilada y se lleva a pH 7,2.
- **TBS-Tween 0,1%**
1 ml de Tween 20 en 1 litro de TBS 1X.
- **BUFFER DE SIEMBRA (*LOADING BUFFER*) 4X**
 - ✓ SDS 6%
 - ✓ β-mercaptoetanol 15% v/v
 - ✓ Glicerol 60%
 - ✓ Tris 0,18 M pH 6,8 0,1 M
 - ✓ Azul de Bromofenol 0,006% p/v
- ***BUFFER DE CORRIDA* 10X**
 - ✓ Tris 30 g/l
 - ✓ Glicina 144 g/l
 - ✓ SDS 10g/l
- ***BUFFER DE TRANSFERENCIA* 10X**
 - ✓ 10% Tris-Glicina 10X (Tris 30 g/l + Glicina 144 g/l)
 - ✓ 20% Metanol
 - ✓ 70% Agua destilada
- **PBS 10X**
 - ✓ Na₂HPO₄·12H₂O 30,06 g/l
 - ✓ NaH₂PO₄·H₂O 2,56 g/l
 - ✓ NaCl 87,6 g/l
- ***BUFFER CITRATO PARA RECAPTURA* (10mM pH=6)**
Trisodio citrato 2,95 g. Llevar a 1 litro con agua destilada y luego llevar a pH=6.

BIBLIOGRAFÍA

- Achuthan, S. et al. (2011). "Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species." *J Biol Chem* 286(43): 37813-37829.
- AlFakeeh, A. et al. (2018). "Overcoming endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer." *Curr Oncol* 25(Suppl 1): S18-S27.
- Ali, S. et al. (2000). "Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(3): 271-281.
- Alves, C. L. et al. (2016). "High CDK6 Protects Cells from Fulvestrant-Mediated Apoptosis and is a Predictor of Resistance to Fulvestrant in Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 22(22): 5514-5526.
- Anders, C. K. et al. (2009). "Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer." *Clin Breast Cancer* 9 Suppl 2: S73-81.
- Anderson, E. J. et al. (2020). "A Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer." *Int J Breast Cancer* 2020: 3759179.
- Andre, F. et al. (2019). "Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer." *N Engl J Med* 380(20): 1929-1940.
- Andrikopoulou, A. et al. (2021). "MicroRNAs as Potential Predictors of Response to CDK4/6 Inhibitor Treatment." *Cancers (Basel)* 13(16).
- Arpino, G. et al. (2004). "HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study." *Clin Cancer Res* 10(17): 5670-5676.
- Arpino, G. et al. (2008). "Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance." *Endocr Rev* 29(2): 217-233.
- Asghar, U. et al. (2015). "The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy." *Nat Rev Drug Discov* 14(2): 130-146.
- Asghar, U. S. et al. (2017). "Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 23(18): 5561-5572.
- Assender, J. W. et al. (2007). "Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer." *J Clin Pathol* 60(11): 1216-1221.
- Averous, J. et al. (2008). "Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1." *Oncogene* 27(8): 1106-1113.

- Bacci, M. et al. (2019). "Reprogramming of Amino Acid Transporters to Support Aspartate and Glutamate Dependency Sustains Endocrine Resistance in Breast Cancer." *Cell Rep* 28(1): 104-118 e108.
- Bader, A. G. et al. (2006). "Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1475-1479.
- Ballinger, T. J. et al. (2018). "Current Landscape of Targeted Therapies for Hormone-Receptor Positive, HER2 Negative Metastatic Breast Cancer." *Front Oncol* 8: 308.
- Baselga, J. et al. (2012). "Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer." *N Engl J Med* 366(6): 520-529.
- Beck, J. T. et al. (2014). "Everolimus plus exemestane as first-line therapy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer in BOLERO-2." *Breast Cancer Res Treat* 143(3): 459-467.
- Beelen, K. et al. (2014). "PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients." *Breast Cancer Res* 16(1): R13.
- Bergamaschi, A. et al. (2014). "The forkhead transcription factor FOXM1 promotes endocrine resistance and invasiveness in estrogen receptor-positive breast cancer by expansion of stem-like cancer cells." *Breast Cancer Res* 16(5): 436.
- Bonelli, M. A. et al. (2017). "Combined Inhibition of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR Pathways Induces a Synergistic Anti-Tumor Effect in Malignant Pleural Mesothelioma Cells." *Neoplasia* 19(8): 637-648.
- Borg, A. et al. (1994). "ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer." *Cancer Lett* 81(2): 137-144.
- Brechbuhl, H. M. et al. (2017). "Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen." *Clin Cancer Res* 23(7): 1710-1721.
- Brockdorff, B. L. et al. (2003). "Resistance to different antiestrogens is caused by different multi-factorial changes and is associated with reduced expression of IGF receptor Ialpha." *Endocr Relat Cancer* 10(4): 579-590.
- Brooks, M. D. et al. (2015). "Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer." *Cell Stem Cell* 17(3): 260-271.
- Burkhart, D. L. et al. (2008). "Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene." *Nat Rev Cancer* 8(9): 671-682.
- Butt, A. J. et al. (2005). "Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E." *Endocr Relat Cancer* 12 Suppl 1: S47-59.
- Buzdar, A. U. (2009). "Role of biologic therapy and chemotherapy in hormone receptor- and HER2-positive breast cancer." *Ann Oncol* 20(6): 993-999.

- Caldon, C. E. et al. (2012). "Cyclin E2 overexpression is associated with endocrine resistance but not insensitivity to CDK2 inhibition in human breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* 11(7): 1488-1499.
- Campos-Parra, A. D. et al. (2017). "Micro-RNAs as Potential Predictors of Response to Breast Cancer Systemic Therapy: Future Clinical Implications." *Int J Mol Sci* 18(6).
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 490(7418): 61-70.
- Carlson, R. W. et al. (2009). "Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology." *J Natl Compr Canc Netw* 7(2): 122-192.
- Cen, L. et al. (2012). "p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells." *Neuro Oncol* 14(7): 870-881.
- Chen, I. C. et al. (2017). "Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors, Buparlisib and Alpelisib, Sensitize Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells to Tamoxifen." *Sci Rep* 7(1): 9842.
- Chen, K. et al. (2013). "Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges." *Acta Pharmacol Sin* 34(6): 732-740.
- Chen, L. et al. (2019). "Everolimus Reverses Palbociclib Resistance in ER+ Human Breast Cancer Cells by Inhibiting Phosphatidylinositol 3-Kinase(PI3K)/Akt/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway." *Med Sci Monit* 25: 77-86.
- Chen, X. et al. (2018). "AKT inhibitor MK-2206 sensitizes breast cancer cells to MLN4924, a first-in-class NEDD8-activating enzyme (NAE) inhibitor." *Cell Cycle* 17(16): 2069-2079.
- Cheng, D. T. et al. (2015). "Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology." *J Mol Diagn* 17(3): 251-264.
- Cheng, J. Q. et al. (2005). "The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery." *Oncogene* 24(50): 7482-7492.
- Cheung, W. K. et al. (2013). "Control of alveolar differentiation by the lineage transcription factors GATA6 and HOPX inhibits lung adenocarcinoma metastasis." *Cancer Cell* 23(6): 725-738.
- Chiarini, F. et al. (2015). "Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer." *Trends Pharmacol Sci* 36(2): 124-135.
- Chu, I. M. et al. (2008). "The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy." *Nat Rev Cancer* 8(4): 253-267.
- Ciruelos, E. et al. (2013). "Role of inhibitors of mammalian target of rapamycin in the treatment of luminal breast cancer." *Anticancer Drugs* 24(8): 769-780.

- Ciruelos Gil, E. M. (2014). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer." *Cancer Treat Rev* 40(7): 862-871.
- Cochrane, D. R. et al. (2014). "Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide." *Breast Cancer Res* 16(1): R7.
- Condorelli, R. et al. (2018). "Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer." *Ann Oncol* 29(3): 640-645.
- Cornell, L. et al. (2019). "MicroRNA-Mediated Suppression of the TGF-beta Pathway Confers Transmissible and Reversible CDK4/6 Inhibitor Resistance." *Cell Rep* 26(10): 2667-2680 e2667.
- Corradetti, M. N. et al. (2006). "Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?" *Oncogene* 25(48): 6347-6360.
- Cortes, J. et al. (2017). "The next era of treatment for hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: Triplet combination-based endocrine therapies." *Cancer Treat Rev* 61: 53-60.
- Couse, J. F. et al. (1997). "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse." *Endocrinology* 138(11): 4613-4621.
- Cristofanilli, M. et al. (2016). "Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial." *Lancet Oncol* 17(4): 425-439.
- Croessmann, S. et al. (2019). "Combined Blockade of Activating ERBB2 Mutations and ER Results in Synthetic Lethality of ER+/HER2 Mutant Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 25(1): 277-289.
- Croxtall, J. D. et al. (2011). "Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women." *Drugs* 71(3): 363-380.
- Cui, X. et al. (2003). "Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer." *Mol Endocrinol* 17(4): 575-588.
- Cuzick, J. et al. (2010). "Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial." *Lancet Oncol* 11(12): 1135-1141.
- Dauvois, S. et al. (1993). "The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling." *J Cell Sci* 106 (Pt 4): 1377-1388.

- Davies, C. et al. (2013). "Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial." *Lancet* 381(9869): 805-816.
- De Amicis, F. et al. (2010). "Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 121(1): 1-11.
- de Leeuw, R. et al. (2018). "MAPK Reliance via Acquired CDK4/6 Inhibitor Resistance in Cancer." *Clin Cancer Res* 24(17): 4201-4214.
- Dean, J. L. et al. (2012). "Therapeutic response to CDK4/6 inhibition in breast cancer defined by ex vivo analyses of human tumors." *Cell Cycle* 11(14): 2756-2761.
- Dean, J. L. et al. (2010). "Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure." *Oncogene* 29(28): 4018-4032.
- deGraffenried, L. A. et al. (2004). "Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity." *Clin Cancer Res* 10(23): 8059-8067.
- DeSantis, C. E. et al. (2019). "Breast cancer statistics, 2019." *CA Cancer J Clin* 69(6): 438-451.
- Dickler, M. N. et al. (2017). "MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR(+)/HER2(-) Metastatic Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 23(17): 5218-5224.
- Dienstmann, R. et al. (2014). "Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors." *Mol Cancer Ther* 13(5): 1021-1031.
- Dogan, I. et al. (2014). "SOX2 expression is an early event in a murine model of EGFR mutant lung cancer and promotes proliferation of a subset of EGFR mutant lung adenocarcinoma cell lines." *Lung Cancer* 85(1): 1-6.
- Dontu, G. et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." *Genes Dev* 17(10): 1253-1270.
- Dowling, R. J. et al. (2010). "Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors." *Biochim Biophys Acta* 1804(3): 433-439.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet* 365(9472): 1687-1717.
- Eccles, S. A. et al. (2013). "Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer." *Breast Cancer Res* 15(5): R92.
- Efeyan, A. et al. (2010). "mTOR and cancer: many loops in one pathway." *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 169-176.
- Elkabets, M. et al. (2013). "mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110alpha inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer." *Sci Transl Med* 5(196): 196ra199.

- Ellis, M. J. et al. (2006). "Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole." *J Clin Oncol* 24(19): 3019-3025.
- Elston, M. S. et al. (2009). "Nuclear accumulation of e-cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas." *J Clin Endocrinol Metab* 94(4): 1436-1442.
- Ertel, A. et al. (2010). "RB-pathway disruption in breast cancer: differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response." *Cell Cycle* 9(20): 4153-4163.
- Faridi, J. et al. (2003). "Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo." *Clin Cancer Res* 9(8): 2933-2939.
- Faronato, M. et al. (2015). "DMXL2 drives epithelial to mesenchymal transition in hormonal therapy resistant breast cancer through Notch hyper-activation." *Oncotarget* 6(26): 22467-22479.
- Finn, R. S. et al. (2015). "The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study." *Lancet Oncol* 16(1): 25-35.
- Finn, R. S. et al. (2009). "PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro." *Breast Cancer Res* 11(5): R77.
- Finn, R. S. et al. (2016). "Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer." *N Engl J Med* 375(20): 1925-1936.
- Foidart, J. M. et al. (1998). "Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells." *Fertil Steril* 69(5): 963-969.
- Formisano, L. et al. (2019). "Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer." *Nat Commun* 10(1): 1373.
- Fox, E. M. et al. (2012). "Abrogating endocrine resistance by targeting ERalpha and PI3K in breast cancer." *Front Oncol* 2: 145.
- Fribbens, C. et al. (2018). "Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer." *Ann Oncol* 29(1): 145-153.
- Fu, X. et al. (2014). "Overcoming endocrine resistance due to reduced PTEN levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase." *Breast Cancer Res* 16(5): 430.
- Fu, X. et al. (2019). "FOXA1 upregulation promotes enhancer and transcriptional reprogramming in endocrine-resistant breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Galan, A. et al. (2016). "Monitoring Stemness in Long-Term hESC Cultures by Real-Time PCR." *Methods Mol Biol* 1307: 89-104.
- Gawrzak, S. et al. (2018). "MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER(+) breast cancer." *Nat Cell Biol* 20(2): 211-221.
- Giltneane, J. M. et al. (2017). "Genomic profiling of ER(+) breast cancers after short-term estrogen suppression reveals alterations associated with endocrine resistance." *Sci Transl Med* 9(402).
- Goetz, M. P. et al. (2017). "MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer." *J Clin Oncol* 35(32): 3638-3646.
- Graham, J. D. et al. (1997). "Physiological action of progesterone in target tissues." *Endocr Rev* 18(4): 502-519.
- Griffith, O. L. et al. (2018). "The prognostic effects of somatic mutations in ER-positive breast cancer." *Nat Commun* 9(1): 3476.
- Guarducci, C. et al. (2018). "Cyclin E1 and Rb modulation as common events at time of resistance to palbociclib in hormone receptor-positive breast cancer." *NPJ Breast Cancer* 4: 38.
- Guertin, D. A. et al. (2006). "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1." *Dev Cell* 11(6): 859-871.
- Guichard, S. M. et al. (2015). "AZD2014, an Inhibitor of mTORC1 and mTORC2, Is Highly Effective in ER+ Breast Cancer When Administered Using Intermittent or Continuous Schedules." *Mol Cancer Ther* 14(11): 2508-2518.
- Gupta, P. B. et al. (2006). "Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth." *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5): 71-78.
- Gwak, J. M. et al. (2017). "Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance." *Oncotarget* 8(22): 36305-36318.
- Hamilton, E. et al. (2016). "Targeting CDK4/6 in patients with cancer." *Cancer Treat Rev* 45: 129-138.
- Han, J. et al. (2010). "Molecular predictors of 3D morphogenesis by breast cancer cell lines in 3D culture." *PLoS Comput Biol* 6(2): e1000684.
- Hanahan, D. et al. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Hanker, A. B. et al. (2020). "Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer." *Cancer Cell* 37(4): 496-513.
- Hartmaier, R. J. et al. (2018). "Recurrent hyperactive ESR1 fusion proteins in endocrine therapy-resistant breast cancer." *Ann Oncol* 29(4): 872-880.

- Hashimoto, K. et al. (2014). "Activated PI3K/AKT and MAPK pathways are potential good prognostic markers in node-positive, triple-negative breast cancer." *Ann Oncol* 25(10): 1973-1979.
- Hennessy, B. T. et al. (2005). "Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 4(12): 988-1004.
- Hernandez-Aya, L. F. et al. (2011). "Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer." *Oncologist* 16(4): 404-414.
- Herrera-Abreu, M. T. et al. (2016). "Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer." *Cancer Res* 76(8): 2301-2313.
- Hers, I. et al. (2011). "Akt signalling in health and disease." *Cell Signal* 23(10): 1515-1527.
- Hollestelle, A. et al. (2007). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines." *Mol Cancer Res* 5(2): 195-201.
- Hortobagyi, G. N. (2018). "Ribociclib for the first-line treatment of advanced hormone receptor-positive breast cancer: a review of subgroup analyses from the MONALEESA-2 trial." *Breast Cancer Res* 20(1): 123.
- Hortobagyi, G. N. et al. (2016). "Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer." *N Engl J Med* 375(18): 1738-1748.
- Horwitz, K. B. et al. (1978). "Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor." *J Biol Chem* 253(7): 2223-2228.
- Horwitz, K. B. et al. (1985). "Progestin action and progesterone receptor structure in human breast cancer: a review." *Recent Prog Horm Res* 41: 249-316.
- Hosokawa, Y. et al. (1998). "Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression." *Genes Chromosomes Cancer* 22(1): 66-71.
- Hu, Y. et al. (2009). "ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays." *J Immunol Methods* 347(1-2): 70-78.
- Ignatiadis, M. et al. (2013). "Luminal breast cancer: from biology to treatment." *Nat Rev Clin Oncol* 10(9): 494-506.
- Ikenoue, T. et al. (2008). "Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling." *EMBO J* 27(14): 1919-1931.
- Inoki, K. et al. (2005). "Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control." *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1): 79-100.
- Isakoff, S. J. et al. (2005). "Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells." *Cancer Res* 65(23): 10992-11000.

- Jahn, S. C. et al. (2013). "Assembly, activation, and substrate specificity of cyclin D1/Cdk2 complexes." *Biochemistry* 52(20): 3489-3501.
- Jallow, F. et al. (2019). "Dynamic interactions between the extracellular matrix and estrogen activity in progression of ER+ breast cancer." *Oncogene* 38(43): 6913-6925.
- Janku, F. et al. (2012). "PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations." *J Clin Oncol* 30(8): 777-782.
- Janku, F. et al. (2018). "Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?" *Nat Rev Clin Oncol* 15(5): 273-291.
- Jansen, V. M. et al. (2017). "Kinome-Wide RNA Interference Screen Reveals a Role for PDK1 in Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer." *Cancer Res* 77(9): 2488-2499.
- Jean, S. et al. (2014). "Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance." *J Cell Sci* 127(Pt 5): 923-928.
- Jeselsohn, R. et al. (2015). "ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer." *Nat Rev Clin Oncol* 12(10): 573-583.
- Jeselsohn, R. et al. (2017). "Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(22): E4482-E4491.
- Jiang, B. H. et al. (2008). "PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1784(1): 150-158.
- Jiang, N. et al. (2020). "Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior." *Mol Biol Rep* 47(6): 4587-4629.
- Jin, K. et al. (2015). "HOXB7 Is an ERalpha Cofactor in the Activation of HER2 and Multiple ER Target Genes Leading to Endocrine Resistance." *Cancer Discov* 5(9): 944-959.
- Joffroy, C. M. et al. (2010). "Anti-estrogens induce transforming growth factor beta-mediated immunosuppression in breast cancer." *Cancer Res* 70(4): 1314-1322.
- Johnston, S. J. et al. (2010). "Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer." *Curr Med Chem* 17(10): 902-914.
- Johnston, S. R. (1997). "Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications." *Anticancer Drugs* 8(10): 911-930.
- Johnston, S. R. et al. (2003). "Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory." *Nat Rev Cancer* 3(11): 821-831.
- Jordan, V. C. (2014). "Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 21(3): R235-246.
- Kato, J. et al. (1993). "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4." *Genes Dev* 7(3): 331-342.

- Kelsey, J. L. et al. (1993). "Reproductive factors and breast cancer." *Epidemiol Rev* 15(1): 36-47.
- Kenny, P. A. et al. (2007). "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression." *Mol Oncol* 1(1): 84-96.
- Kim, W. Y. et al. (2006). "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging." *Cell* 127(2): 265-275.
- Klawitter, J. et al. (2015). "Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different." *Expert Opin Drug Saf* 14(7): 1055-1070.
- Knowlden, J. M. et al. (2005). "Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor." *Endocrinology* 146(11): 4609-4618.
- Kong, D. et al. (2020). "Cellular Plasticity in Breast Cancer Progression and Therapy." *Front Mol Biosci* 7: 72.
- Kreisberg, J. I. et al. (2004). "Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer." *Cancer Res* 64(15): 5232-5236.
- Lanari, C. et al. (2009). "The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 16(2): 333-350.
- Lang, C. H. et al. (2005). "Endotoxin disrupts the leucine-signaling pathway involving phosphorylation of mTOR, 4E-BP1, and S6K1 in skeletal muscle." *J Cell Physiol* 203(1): 144-155.
- Lange, C. A. (2004). "Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word?" *Mol Endocrinol* 18(2): 269-278.
- Lauring, J. et al. (2013). "The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer." *J Natl Compr Canc Netw* 11(6): 670-678.
- Lazaridis, G. et al. (2014). "Prognostic and predictive value of p-Akt, EGFR, and p-mTOR in early breast cancer." *Strahlenther Onkol* 190(7): 636-638, 640-635.
- Lee, J. J. et al. (2015). "PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer." *Cancer Biol Med* 12(4): 342-354.
- Lefebvre, C. et al. (2016). "Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis." *PLoS Med* 13(12): e1002201.
- Leung, E. Y. et al. (2017). "Endocrine Therapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Early Differential Effects on Stem Cell Markers." *Front Oncol* 7: 184.
- Levine, K. M. et al. (2019). "FGFR4 overexpression and hotspot mutations in metastatic ER+ breast cancer are enriched in the lobular subtype." *NPJ Breast Cancer* 5: 19.

- Li, D. et al. (2014). "Sox2 is involved in paclitaxel resistance of the prostate cancer cell line PC-3 via the PI3K/Akt pathway." *Mol Med Rep* 10(6): 3169-3176.
- Li, H. et al. (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760.
- Li, Y. et al. (2015). "Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(6): 1839-1844.
- Li, Z. et al. (2018). "Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway." *Cancer Cell* 34(6): 893-905 e898.
- Li, Z. et al. (2012). "Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells." *Oncol Rep* 27(6): 1879-1886.
- Liang, J. et al. (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." *Cell Cycle* 2(4): 339-345.
- Lin, X. et al. (2006). "Overexpression of PKC α is required to impart estradiol inhibition and tamoxifen-resistance in a T47D human breast cancer tumor model." *Carcinogenesis* 27(8): 1538-1546.
- Litchfield, L. M. et al. (2020). "Combined inhibition of PIM and CDK4/6 suppresses both mTOR signaling and Rb phosphorylation and potentiates PI3K inhibition in cancer cells." *Oncotarget* 11(17): 1478-1492.
- Liu, M. et al. (2018). "Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review)." *Oncol Rep* 39(3): 901-911.
- Liu, P. et al. (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." *Nat Rev Drug Discov* 8(8): 627-644.
- Lombardo, Y. et al. (2014). "Nicastrin and Notch4 drive endocrine therapy resistance and epithelial to mesenchymal transition in MCF7 breast cancer cells." *Breast Cancer Res* 16(3): R62.
- Lopez-Knowles, E. et al. (2010). "PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality." *Int J Cancer* 126(5): 1121-1131.
- Luca, A. C. et al. (2013). "Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines." *PLoS One* 8(3): e59689.
- Lux, M. P. et al. (2016). "The PI3K Pathway: Background and Treatment Approaches." *Breast Care (Basel)* 11(6): 398-404.
- Ma, C. X. et al. (2017). "NeoPalAna: Neoadjuvant Palbociclib, a Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor, and Anastrozole for Clinical Stage 2 or 3 Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 23(15): 4055-4065.
- Mal, R. et al. (2020). "Estrogen Receptor Beta (ER β): A Ligand Activated Tumor Suppressor." *Front Oncol* 10: 587386.

- Manuel Iglesias, J. et al. (2013). "Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin." *PLoS One* 8(10): e77281.
- McGuire, W. L. et al. (1991). "Estrogen receptor variants in clinical breast cancer." *Mol Endocrinol* 5(11): 1571-1577.
- Mendiburu-Elicabe, M. et al. (2014). "Efficacy of rapamycin against glioblastoma cancer stem cells." *Clin Transl Oncol* 16(5): 495-502.
- Merenbakh-Lamin, K. et al. (2013). "D538G mutation in estrogen receptor-alpha: A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer." *Cancer Res* 73(23): 6856-6864.
- Metz, H. E. et al. (2011). "Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase." *Clin Cancer Res* 17(2): 206-211.
- Meyuhas, O. (2008). "Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind." *Int Rev Cell Mol Biol* 268: 1-37.
- Meyuhas, O. (2015). "Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research." *Int Rev Cell Mol Biol* 320: 41-73.
- Michaloglou, C. et al. (2018). "Combined Inhibition of mTOR and CDK4/6 Is Required for Optimal Blockade of E2F Function and Long-term Growth Inhibition in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer." *Mol Cancer Ther* 17(5): 908-920.
- Michor, F. et al. (2010). "The origins and implications of intratumor heterogeneity." *Cancer Prev Res (Phila)* 3(11): 1361-1364.
- Miller, T. W. et al. (2011). "ERalpha-dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer." *Cancer Discov* 1(4): 338-351.
- Miller, T. W. et al. (2010). "Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer." *J Clin Invest* 120(7): 2406-2413.
- Morotti, M. et al. (2019). "Hypoxia-induced switch in SNAT2/SLC38A2 regulation generates endocrine resistance in breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(25): 12452-12461.
- Morris-Hanon, O. et al. (2019). "Palbociclib Effectively Halts Proliferation but Fails to Induce Senescence in Patient-Derived Glioma Stem Cells." *Mol Neurobiol* 56(11): 7810-7821.
- Mukhopadhyay, S. et al. (2016). "The Enigma of Rapamycin Dosage." *Mol Cancer Ther* 15(3): 347-353.
- Mukohara, T. (2015). "PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications." *Breast Cancer (Dove Med Press)* 7: 111-123.
- Musgrove, E. A. et al. (2011). "Cyclin D as a therapeutic target in cancer." *Nat Rev Cancer* 11(8): 558-572.

- Musgrove, E. A. et al. (2009). "Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer." *Nat Rev Cancer* 9(9): 631-643.
- Nagasawa, H. et al. (1988). "Medroxyprogesterone acetate enhances spontaneous mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in mice." *Breast Cancer Res Treat* 12(1): 59-66.
- Nakanishi, T. et al. (2012). "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression." *Chin J Cancer* 31(2): 73-99.
- Natarajan, K. et al. (2012). "Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance." *Biochem Pharmacol* 83(8): 1084-1103.
- Nayar, U. et al. (2019). "Acquired HER2 mutations in ER(+) metastatic breast cancer confer resistance to estrogen receptor-directed therapies." *Nat Genet* 51(2): 207-216.
- Nelson, C. M. et al. (2006). "Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 287-309.
- Newby, J. C. et al. (1997). "Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer." *Clin Cancer Res* 3(9): 1643-1651.
- Nilsson, S. et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." *Physiol Rev* 81(4): 1535-1565.
- Noh, W. C. et al. (2008). "Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables." *Breast Cancer Res Treat* 110(3): 477-483.
- O'Brien, N. A. et al. (2020). "Targeting activated PI3K/mTOR signaling overcomes acquired resistance to CDK4/6-based therapies in preclinical models of hormone receptor-positive breast cancer." *Breast Cancer Res* 22(1): 89.
- O'Leary, B. et al. (2018). "The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial." *Cancer Discov* 8(11): 1390-1403.
- Obr, A. E. et al. (2012). "The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* 357(1-2): 4-17.
- Olanich, M. E. et al. (2015). "CDK4 Amplification Reduces Sensitivity to CDK4/6 Inhibition in Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma." *Clin Cancer Res* 21(21): 4947-4959.
- Oleksiewicz, M. B. et al. (2011). "Comparison of intracellular signalling by insulin and the hypermitogenic AspB10 analogue in MCF-7 breast adenocarcinoma cells." *J Appl Toxicol* 31(4): 329-341.
- Ono, M. et al. (2021). "The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time." *J Cancer Res Clin Oncol* 147(11): 3211-3224.

- Palmieri, C. et al. (2002). "Estrogen receptor beta in breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 9(1): 1-13.
- Palmieri, C. et al. (2014). "Breast cancer: current and future endocrine therapies." *Mol Cell Endocrinol* 382(1): 695-723.
- Pan, H. et al. (2017). "20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years." *N Engl J Med* 377(19): 1836-1846.
- Pancholi, S. et al. (2020). "Tumour kinome re-wiring governs resistance to palbociclib in oestrogen receptor positive breast cancers, highlighting new therapeutic modalities." *Oncogene* 39(25): 4781-4797.
- Pandey, K. et al. (2019). "Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review." *Int J Cancer* 145(5): 1179-1188.
- Pandey, K. et al. (2020). "Combined CDK2 and CDK4/6 Inhibition Overcomes Palbociclib Resistance in Breast Cancer by Enhancing Senescence." *Cancers (Basel)* 12(12).
- Paplomata, E. et al. (2014). "The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers." *Ther Adv Med Oncol* 6(4): 154-166.
- Parker, P. J. et al. (1985). "The phosphorylation of eukaryotic ribosomal protein S6 by protein kinase C." *Eur J Biochem* 148(3): 579-586.
- Patten, D. K. et al. (2018). "Enhancer mapping uncovers phenotypic heterogeneity and evolution in patients with luminal breast cancer." *Nat Med* 24(9): 1469-1480.
- Pearson, A. et al. (2020). "Inactivating NF1 Mutations Are Enriched in Advanced Breast Cancer and Contribute to Endocrine Therapy Resistance." *Clin Cancer Res* 26(3): 608-622.
- Perez-Tenorio, G. et al. (2006). "Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 correlates with Akt activation and poor response to tamoxifen in breast cancer." *Int J Oncol* 28(5): 1031-1042.
- Petz, L. N. et al. (2004). "Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites." *J Steroid Biochem Mol Biol* 88(2): 113-122.
- Phi, L. T. H. et al. (2018). "Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment." *Stem Cells Int* 2018: 5416923.
- Piccart, M. et al. (2014). "Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2dagger." *Ann Oncol* 25(12): 2357-2362.
- Piva, M. et al. (2014). "Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells." *EMBO Mol Med* 6(1): 66-79.
- Polo, M. L. et al. (2015). "Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling in the tumor stroma drives endocrine therapy-dependent breast tumor regression." *Oncotarget* 6(26): 22081-22097.

- Portman, N. et al. (2019). "Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 26(1): R15-R30.
- Puglisi, F. et al. (2012). "Overcoming treatment resistance in HER2-positive breast cancer: potential strategies." *Drugs* 72(9): 1175-1193.
- Rader, J. et al. (2013). "Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma." *Clin Cancer Res* 19(22): 6173-6182.
- Razavi, P. et al. (2018). "The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers." *Cancer Cell* 34(3): 427-438 e426.
- Ribas, R. et al. (2015). "AKT Antagonist AZD5363 Influences Estrogen Receptor Function in Endocrine-Resistant Breast Cancer and Synergizes with Fulvestrant (ICI182780) In Vivo." *Mol Cancer Ther* 14(9): 2035-2048.
- Richards, S. et al. (2015). "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." *Genet Med* 17(5): 405-424.
- Riggins, R. B. et al. (2007). "Pathways to tamoxifen resistance." *Cancer Lett* 256(1): 1-24.
- Riggio, M. et al. (2017). "AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins." *Sci Rep* 7: 44244.
- Robinson, D. R. et al. (2013). "Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer." *Nat Genet* 45(12): 1446-1451.
- Rodriguez, D. et al. (2019). "The Central Contributions of Breast Cancer Stem Cells in Developing Resistance to Endocrine Therapy in Estrogen Receptor (ER)-Positive Breast Cancer." *Cancers (Basel)* 11(7).
- Romero-Pozuelo, J. et al. (2020). "Cdk4 and Cdk6 Couple the Cell-Cycle Machinery to Cell Growth via mTORC1." *Cell Rep* 31(2): 107504.
- Ross, J. S. et al. (2009). "The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine." *Oncologist* 14(4): 320-368.
- Rousseau-Merck, M. F. et al. (1987). "Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23." *Hum Genet* 77(3): 280-282.
- Roux, P. P. et al. (2007). "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation." *J Biol Chem* 282(19): 14056-14064.
- Salmond, R. J. et al. (2009). "MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase, and mammalian target of rapamycin pathways converge at the level of ribosomal protein S6 phosphorylation to control metabolic signaling in CD8 T cells." *J Immunol* 183(11): 7388-7397.
- Sarbassov, D. D. et al. (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." *Mol Cell* 22(2): 159-168.

- Saxton, R. A. et al. (2017). "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* 168(6): 960-976.
- Schmid, P. et al. (2019). "Fulvestrant Plus Vistusertib vs Fulvestrant Plus Everolimus vs Fulvestrant Alone for Women With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: The MANTA Phase 2 Randomized Clinical Trial." *JAMA Oncol* 5(11): 1556-1564.
- Schmitt, C. A. (2007). "Cellular senescence and cancer treatment." *Biochim Biophys Acta* 1775(1): 5-20.
- Sellami, D. et al. (2017). "Circulating tumor DNA as a novel tool to shape clinical trial designs with the potential to impact outcomes: a focus on PI3K inhibitors." *Ann Oncol* 28(11): 2882-2887.
- Shah, O. J. et al. (2006). "Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis." *Mol Cell Biol* 26(17): 6425-6434.
- Sherr, C. J. et al. (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Shiino, S. et al. (2016). "Prognostic Impact of Discordance in Hormone Receptor Status Between Primary and Recurrent Sites in Patients With Recurrent Breast Cancer." *Clin Breast Cancer* 16(4): e133-140.
- Shiozawa, Y. et al. (2013). "Cancer stem cells and their role in metastasis." *Pharmacol Ther* 138(2): 285-293.
- Singh, R. K. et al. (2017). "Protein kinase C-alpha and the regulation of diverse cell responses." *Biomol Concepts* 8(3-4): 143-153.
- Slamon, D. J. et al. (2018). "Phase III Randomized Study of Ribociclib and Fulvestrant in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: MONALEESA-3." *J Clin Oncol* 36(24): 2465-2472.
- Sledge, G. W., Jr. et al. (2017). "MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy." *J Clin Oncol* 35(25): 2875-2884.
- Sokol, E. S. et al. (2019). "Loss of function of NF1 is a mechanism of acquired resistance to endocrine therapy in lobular breast cancer." *Ann Oncol* 30(1): 115-123.
- Span, P. N. et al. (2003). "Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer." *Oncogene* 22(31): 4898-4904.
- Spoerke, J. M. et al. (2016). "Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant." *Nat Commun* 7: 11579.
- Steelman, L. S. et al. (2011). "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging." *Aging (Albany NY)* 3(3): 192-222.

- Stemke-Hale, K. et al. (2008). "An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer." *Cancer Res* 68(15): 6084-6091.
- Stone, A. et al. (2015). "DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer." *Nat Commun* 6: 7758.
- Svoronos, N. et al. (2017). "Tumor Cell-Independent Estrogen Signaling Drives Disease Progression through Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells." *Cancer Discov* 7(1): 72-85.
- Szostakowska, M. et al. (2019). "Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals." *Breast Cancer Res Treat* 173(3): 489-497.
- The, L. (2018). "GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer." *Lancet* 392(10152): 985.
- Todd, M. C. et al. (2017). "Doxycycline-Regulated p16(MTS1) Expression Suppresses the Anchorage-Independence and Tumorigenicity of Breast Cancer Cell Lines that Lack Endogenous p16." *J Cancer* 8(2): 190-198.
- Tokunaga, E. et al. (2006). "Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer." *Breast Cancer* 13(2): 137-144.
- Toy, W. et al. (2013). "ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer." *Nat Genet* 45(12): 1439-1445.
- Tsai, M. J. et al. (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." *Annu Rev Biochem* 63: 451-486.
- Turner, N. C. et al. (2019). "Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer." *J Clin Oncol* 37(14): 1169-1178.
- Valovka, T. et al. (2003). "Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase betaII and regulates its subcellular localization." *Mol Cell Biol* 23(3): 852-863.
- Van der Auwera, G. A. et al. (2013). "From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline." *Curr Protoc Bioinformatics* 43: 11 10 11-11 10 33.
- Vasan, N. et al. (2019). "Double PIK3CA mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kalpha inhibitors." *Science* 366(6466): 714-723.
- Vilquin, P. et al. (2013). "Molecular characterization of anastrozole resistance in breast cancer: pivotal role of the Akt/mTOR pathway in the emergence of de novo or acquired resistance and importance of combining the allosteric Akt inhibitor MK-2206 with an aromatase inhibitor." *Int J Cancer* 133(7): 1589-1602.
- Wang, J. et al. (2009). "Fulvestrant in advanced breast cancer following tamoxifen and aromatase inhibition: a single center experience." *Breast J* 15(3): 247-253.
- Wang, K. et al. (2010). "ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data." *Nucleic Acids Res* 38(16): e164.

- Wang, R. et al. (2017). "Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism." *Aging Cell* 16(3): 564-574.
- Warner, M. et al. (2010). "The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 63-66.
- Witcher, M. et al. (2009). "Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary." *Mol Cell* 34(3): 271-284.
- Woo, S. U. et al. (2017). "Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway is synergistic in breast cancer." *Oncogenesis* 6(10): e385.
- Wu, A. et al. (2011). "Elevated expression of CDK4 in lung cancer." *J Transl Med* 9: 38.
- Xi, J. et al. (2020). "Sequencing Endocrine Therapy for Metastatic Breast Cancer: What Do We Do After Disease Progression on a CDK4/6 Inhibitor?" *Curr Oncol Rep* 22(6): 57.
- Xu, B. et al. (2017). "Utilizing Tumor and Plasma Liquid Biopsy in Treatment Decision Making for an Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer Patient." *Cureus* 9(6): e1408.
- Yang, C. et al. (2017). "Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence." *Oncogene* 36(16): 2255-2264.
- Yang, J. et al. (2015). "Estrogen receptor-alpha directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(49): 15172-15177.
- Yang, L. et al. (2017). "Tumor cell senescence response produces aggressive variants." *Cell Death Discov* 3: 17049.
- Yardley, D. A. et al. (2013). "Everolimus plus exemestane in postmenopausal patients with HR(+) breast cancer: BOLERO-2 final progression-free survival analysis." *Adv Ther* 30(10): 870-884.
- Yu, L. et al. (2021). "Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer." *Semin Cancer Biol*.
- Zacharek, S. J. et al. (2005). "Negative regulation of TSC1-TSC2 by mammalian D-type cyclins." *Cancer Res* 65(24): 11354-11360.
- Zardavas, D. et al. (2014). "PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data." *Breast Cancer Res* 16(1): 201.
- Zhang, J. et al. (2016). "Inhibition of Rb Phosphorylation Leads to mTORC2-Mediated Activation of Akt." *Mol Cell* 62(6): 929-942.
- Zhang, X. H. et al. (2013). "Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer." *Clin Cancer Res* 19(23): 6389-6397.

- Zhao, J. J. et al. (2005). "The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18443-18448.
- Zhao, L. et al. (2008). "Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2652-2657.
- Zhao, Y. et al. (2019). "Nuclear E-Cadherin Acetylation Promotes Colorectal Tumorigenesis via Enhancing beta-Catenin Activity." *Mol Cancer Res* 17(2): 655-665.
- Zhou, C. et al. (2012). "Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration." *Breast Cancer Res* 14(2): R45.
- Zhou, S. et al. (2001). "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." *Nat Med* 7(9): 1028-1034.