



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**“La actividad transcripcional de RUNX1 favorece un fenotipo de resistencia a drogas quimioterapéuticas en el cáncer de mama triple negativo”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Licenciada Sofía María Sosa**

Directora de tesis: Dra. Natalia Rubinstein

Consejero de estudios: Dr. Martín Monte

Laboratorio de Mecanismos Moleculares de la Metástasis

Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (iB3)

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular - FCEN, UBA

Buenos Aires, 2024

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
I. Cáncer y proceso metastásico	14
Metástasis	15
Heterogeneidad tumoral	22
Quimioresistencia	23
II. Cáncer de mama	28
Incidencia	28
Clasificación	29
Pronóstico y tratamiento	31
III. Cáncer de mama triple negativo	33
Caracterización y clasificación	33
Terapias y tratamiento	36
TNBC- Heterogeneidad tumoral	41
TNBC- Quimioresistencia	43
TNBC-CSCs	44
IV. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX	47
Estructura y caracterización de la familia RUNX	47
RUNX como regulador clave del destino de las células madre	50
RUNX y cáncer de mama	53
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
I. Drogas	60
II. Líneas celulares	60
III. Transfección de células	61
b- Midiprep: purificación del plásmido	62
c- Ensayo de transfección	62
IV. Generación de mamósferas	63
V. Generación del modelo de células en suspensión forzada	64
VI. Generación de células resistentes a drogas quimioterapéuticas	65
VII. Ensayo de viabilidad celular	66

VIII. Ensayo de apoptosis	66
IX. Ensayo de migración	67
X. Ensayo de PCR	68
a- Extracción de RNA	68
b- Retrotranscripción	69
c- qPCR	69
d-Secuencias de Primers	70
XI. Western-Blot	70
a- Extracción de proteínas	70
b- SDS-PAGE	71
XII. Ensayo ex-vivo	72
XIII. Ensayo de acumulación de doxorubicina	73
XIV. Inmunofluorescencia	73
XV. Buffers y soluciones	75
XVI. Análisis estadístico	77
<b>RESULTADOS</b>	<b>78</b>
Objetivo 1:	
Evaluar la relevancia de la actividad transcripcional de RUNX1 y RUNX2 en procesos tumorales.	82
1.1: Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en la viabilidad celular:	83
1.2: Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en inducción de la muerte celular programada (apoptosis):	85
1.3: Efecto sobre la pérdida de función de RUNX en la migración celular	94
1.4: Evaluación de la capacidad transcripcional de RUNX de modular características de la subpoblación stem	99
1.6: Participación de RUNX en el fenómeno de latencia tumoral o dormancy	104
1.7: Ensayo ex vivo	107
Conclusiones del objetivo 1	109
Objetivo 2:	
Estudiar la sensibilidad de las líneas celulares humanas de TNBC a drogas quimioterapéuticas al reducir la actividad transcripcional de RUNX.	110
2.1: Búsqueda de la dosis de trabajo de Doxorrubicina y de Paclitaxel	110
2.2: Evaluación de la expresión de genes de interés luego del tratamiento con drogas quimioterapéuticas	114
2.3: Efecto de la combinación de drogas quimioterapéuticas con el inhibidor de la actividad transcripcional de RUNX	118
Conclusiones del objetivo 2	128
Objetivo 3:	130
Investigar los posibles mecanismos involucrados en la modulación de la sensibilidad a drogas mediada por RUNX.	130
Conclusiones del objetivo 3	139

Objetivo 4:	140
Evaluar si el receptor de glucocorticoides (GR) es capaz de regular la expresión de RUNX1.	140
Conclusiones del objetivo 4	145
<b>CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN</b>	<b>146</b>
→ Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en la supervivencia celular	147
→ Evaluación de la capacidad migratoria celular tras el bloqueo de la actividad transcripcional de RUNX	148
→ Evaluación de la capacidad de RUNX de modular características de la subpoblación stem	149
→ Participación de RUNX en el fenómeno de dormancy	152
→ Evaluación de la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en un ensayo ex-vivo	154
→ Evaluación de la expresión de genes de interés luego del tratamiento con drogas quimioterapéuticas	155
→ Evaluación del tratamiento combinado: AI-10-104 y drogas quimioterapéuticas	158
→ Estudio de la relevancia de los transportadores ABC en nuestro modelo de estudio	161
→ Evaluación de la regulación exógena de la expresión de RUNX1	163
RUNX en el ecosistema tumoral: conclusión final	165
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>169</b>

# ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADC	<i>Antibody-Drug Conjugates</i> - Conjugados Droga-Anticuerpo
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ADNc	ADN Complementario
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i> - Leucemia Linfoblástica Aguda
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i> - Leucemia Mieloide Aguda
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNm	ARN Mensajero
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> - Proteína de Resistencia al Cáncer de Mama
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albúmina Bovina Sérica
BsAbs	<i>Bispecific Antibodies</i> - Anticuerpos Biespecíficos
CAF	<i>Cancer Associated Fibroblasts</i> - Fibroblastos asociados a cáncer
CBF	<i>Core Binding Factor</i> - Factor de Union Central
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i> - Células stem tumorales
CV	<i>Crystal Violet</i> - Cristal Violeta
DDR	<i>DNA Damage Response</i> - Respuesta de Daño al ADN
Dexa	Dexametasona
DFS	<i>Disease Free Survival</i> - Sobrevida libre de enfermedad
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	DiMetilSulfóxido
DN	Dominante Negativo
dNTPs	DesoxirriboNucleótidos TriFosfato
Doxo	Doxorrubicina
DTP	<i>Drug Tolerant Persistent</i> - Persistentes Tolerantes a Droga
EHT	<i>Endothelial Hematopoietic Transition</i> - Transición Endotelial Hematopoyética
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i> - Transición Epitelial Mesenquimal
ER	<i>Estrogen Receptor</i> - Receptor de Estrógeno
FPD/AML	<i>Familial Platelet Disorder with predisposition to AML</i> - Trastorno Plaquetario Familiar con predisposición a AML
g	gramos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GILZ	<i>Glucocorticoid-induced leucine zipper</i>
GJA1	<i>Gap Junction Protein Alpha 1</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i> - Receptor de Glucocorticoideos
hbFGF	<i>Human Basic Fibroblast Growth Factor</i> - Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos Humano
hEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i> - Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> - Célula Madre Hematopoyética
IC50	Concentración Inhibitoria 50%
ICI	<i>Immune Checkpoint Inhibitor</i> - Inhibidor de punto de control inmune
ID	<i>Inhibitory Domain</i> - Dominio Inhibitorio
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4 Transcription Factor</i>

MaSC	<i>Mammary Stem Cell</i> - Célula Madre Mamaria
MDR	<i>MultiDrug Resistance</i> - Resistencia Multidrogas
MDS	<i>Myelodysplastic syndrome</i> - Síndrome Mielodisplásico
MEC	Matriz Extracelular
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i> - Transición Mesenquimal Epitelial
mg	miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MIC	<i>Metastasis Initiating Cell</i> - Célula Iniciadora de Metástasis
Mife	Mifepristone
ml	mililitro
mM	milimolar
MRP	<i>Multi Resistant Protein</i> - Proteína Multi Resistente
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> - Célula Madre Mesenquimal
NA	Apertura Numérica
NACT	<i>NeoAdjuvant ChemoTherapy</i> - Terapia Neoadyuvante
ng	nanogramos
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> - Señal de Localización Nuclear
NMTS	Nuclear Matrix Targeting Sequence
NR2F1	Nuclear Receptor subfamily 2 group F member 1
NSG	<i>NOD scid gamma mouse</i>
OCT4	<i>Octamer Binding Transcription Factor 4</i>
od'T	Oligodesoxitimina
ON	<i>Overnight</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARPis	<i>Poly Adenosine diphosphate-(ADP)-Ribose Polymerase Inhibitors</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Solución salina tamponada con fosfato
pCR	<i>Pathological Complete Response</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand</i>
PEI	Polietilenimina
PFA	Parafomaldehido
PFS	<i>Progression Free Survival</i> - Sobrevida libre de progresión
PR	<i>Progesterone Receptor</i> - Receptor de Progesterona
PX	Paclitaxel
QA	Quimioattractante
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
QT	Quimioterapia
RA	Receptor de Andrógenos
RHD	<i>Runt Homology Domain</i> - Dominio de Homología <i>Runt</i>
RT	Retrotranscripción
RUNX1	<i>Runt related transcription factors</i>
SC	<i>Stem Cell</i> - Célula Madre
SDS	Dodecil Sulfato Sodico
SFB	Suero Fetal Bovino
STAN	
T-TBS	<i>Tween Tris Buffer Solution</i> - Solución Salina Tamponada con Tris Tween

TAD	TRANSACTIVATION DOMAIN
TBS	<i>Tris Buffer Solution</i> - Solución Salina Tamponada con Tris
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> - Linfocitos Infiltrantes de Tumor
TME	<i>Tumoral MicroEnvironment</i> - Microambiente tumoral
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i> - Cancer de mama triple negativo
ul	microlitros
ug	microgramos
uM	micromolar
UV	Ultravioleta

# AGRADECIMIENTOS

A la UBA, por la educación pública, gratuita y de calidad.

A la investigación pública.

A la FCEN, por haberme formado no solo académicamente, sino también personalmente; por haberme dado un grupo de amigas hermoso y por haberme permitido ser parte de clases espectaculares.

Al INC y a CONICET, por las becas otorgadas que permitieron el desarrollo de la tesis y carrera.

Al grupo Mecanismos Moleculares de la Metástasis: Nati, Naty, Facu y Lu, por su ayuda siempre que la necesité, por sus sugerencias y devoluciones de experimentos y por formar un gran equipo. Los quiero y los voy a extrañar!! Quiero agradecerle puntualmente a Nati, por su lado tan humano y protector.

A todo el ib3 por el apoyo durante el doctorado, por los préstamos de material y reactivos, y sobre todo por la buena onda de todos.

A Gabi Romero, siempre dispuesta a ayudar en cualquier trámite necesario. A Sebas y Majo, por hacer que el trabajo del laboratorio sea menos pesado. A Vicky del Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber por la asistencia y las fotos obtenidas en los microscopios. A Guillermo, por su asistencia en los citómetros de flujo.

A mi familia: Mamá y papá, por haberme bancado durante toda la carrera, y haberme apoyado y alentado. Por inculcarme valores que hoy tanto agradezco. Por defender a la UBA y a la investigación siempre. Por cuidar a Mateo todos los días para que yo pudiera escribir la tesis. A mis hermanas, por también ayudarme con Mateo y por siempre encontrar ratos para desconectar y brindarme su apoyo incondicional.

A Nacho, por escucharme practicar presentaciones, por prestarme atención cada día hablándole de mi día en el laboratorio, por preguntarme por mis experimentos aunque no entendiera mucho, por hacer todas las tareas de la casa solo mientras yo escribía, por darle tanto amor a Mateo.

A Mateo, por su existencia.

## RESUMEN

### **La actividad transcripcional de RUNX favorece un fenotipo de resistencia a drogas quimioterapéuticas en el cáncer de mama triple negativo.**

El cáncer de mama triple negativo (TNBC del inglés *triple negative breast cancer*) reúne al grupo de tumores de mama que no expresan receptores de hormonas (estrógeno y progesterona) y han perdido (o no está amplificada) la expresión del gen Her2/Neu+. Está asociado a la transición epitelio mesenquimal y al enriquecimiento de células madre tumorales, ambos procesos involucrados en la resistencia a la quimioterapia. La falta de un blanco terapéutico específico genera un riesgo de recurrencia de entre 1 a 3 años y un aumento del 40% en la tasa de mortalidad dentro de los primeros 5 años, significativamente mayor a los tumores no-TNBC.

En la búsqueda de marcadores de pronóstico en TNBC ha sido reportado, entre otros, que la expresión del factor de transcripción RUNX1 correlaciona con un peor pronóstico en este grupo de pacientes. Nuestro grupo reportó que RUNX1 está implicado en la malignización de células epiteliales mamarias TNBC y en la quimioresistencia de líneas celulares TNBC respondedoras a andrógenos.

El objetivo de mi trabajo fue evaluar la participación de RUNX durante el tratamiento quimioterapéutico en líneas celulares humanas TNBC. Teniendo en cuenta la heterogeneidad intra tumoral presente en dicho subtipo establecí cuatro modelos de cultivo celular: células creciendo en condición estándar (adheridas), células creciendo en suspensión forzada, simulando las células circulantes de tumor con fenotipo stem-like, células creciendo en suspensión forzada en medio de cultivo que favorece la formación de mamosferas que simulan las células madre tumorales (del inglés *cancer stem cells* o CSCs), y células resistentes a paclitaxel creciendo en condiciones estándar (adheridas).

En primer lugar, las células TNBC (MDA-MB-231/468) fueron tratadas con un inhibidor de la actividad transcripcional de RUNX1 comercial (AI-10-104). Observamos una disminución en la viabilidad y en la migración celular; y un aumento en la apoptosis. En modelos de cultivo en suspensión, determinamos que RUNX participa en la generación de CSCs ya que tratarlas con AI-10-104 impide la formación de mamosferas y reduce la expresión de marcadores *stem*.

La expresión de *RUNX1* se ve aumentada luego del tratamiento de las líneas celulares con drogas terapéuticas como paclitaxel y doxorrubicina. A su vez, su expresión se encuentra

aumentada en la población de suspendidas (población *stem-like*) con respecto a la población de adheridas, y en la de células resistentes a paclitaxel con respecto a la población control. Reducir la actividad transcripcional de RUNX aumenta la sensibilidad de las células a dichas drogas, ya que la combinación de estas drogas con AI-10-104 disminuye significativamente la viabilidad y aumenta la apoptosis con respecto a las drogas y el inhibidor por separado. Este mismo efecto también fue observado en las mamósferas. Más aún, tratar a las células resistentes a paclitaxel con el AI revirtió la resistencia alcanzada, observada a través de la modulación del valor de IC50.

Para explorar el mecanismo a través del cual RUNX modula la sensibilidad a drogas, estudiamos los transportadores ABC, uno de los mediadores descritos que tienen las CSCs para resistir la toxicidad de las drogas. Inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la expresión del mRNA de *ABCC1*, tanto en el modelo de adheridas, como en suspendidas. Estos resultados sugieren que RUNX podría estar involucrado en la generación de resistencia a quimioterapia en líneas celulares TNBC a través de la regulación de la expresión de este gen.

Por último, el receptor de glucocorticoides (GR) ha sido identificado como un mediador necesario para la generación de CSC y de resistencia a paclitaxel en líneas celulares humanas de TNBC. En este trabajo encontramos un potencial sitio de unión a ADN para GRs en la zona promotora del gen de *RUNX1*. Las líneas celulares TNBC tratadas con dexametasona (agonista de GR) aumentan la expresión de mRNA de *RUNX1*, y al tratarlas con mifepristone (antagonista de GR), esa expresión retoma los niveles basales de expresión. De esta manera, *RUNX1* podría ser regulado exógenamente.

Basándonos en toda esta información, identificamos a RUNX como un blanco terapéutico interesante para el tratamiento de pacientes TNBC.

**Palabras clave:** TNBC, RUNX, quimioresistencia, CSC, GR.

## ABSTRACT

### **RUNX transcriptional activity favors a fingerprint of chemotherapeutic drug resistance in triple negative breast cancer**

Triple negative breast cancer is a heterogeneous disease that includes all breast cancer subtypes that have no expression of estrogen and progesterone receptors, nor amplification of Her2/Neu+. TNBC is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and an enrichment in cancer stem cell (CSC) population which, according to growing evidence, are both involved in tumor chemoresistance. Due to the lack of specific therapeutic targets, treatment options are limited and patients are consequently managed with standard chemotherapy, which poses a recurrence risk between 1 to 3 years and a 40% increase in mortality rate within the first 5 years, significantly higher compared to non-TNBC tumors. In the search for prognostic markers in TNBC, it has been reported, among others, that the expression of the transcription factor RUNX1 correlates with a worse prognosis in this group of patients. Our group reported that RUNX1 is involved in the malignancy of TNBC mammary epithelial cells and in the chemoresistance of androgen-responsive TNBC cell lines.

The aim of my study was to evaluate the involvement of RUNX during chemotherapy treatment in human TNBC cell lines. Considering the intratumoral heterogeneity present in this subtype, I established four cell culture models: cells growing under standard conditions (adherent), cells growing under forced suspension, mimicking circulating tumor cells with a stem-like phenotype, cells growing under forced suspension in culture medium favoring mammosphere formation, simulating cancer stem cells (or CSCs), and paclitaxel-resistant cells growing under standard conditions (adherent).

Firstly, TNBC cells (MDA-MB-231/468) were treated with a commercial inhibitor of RUNX1 transcriptional activity (AI-10-104). We observed a decrease in cell viability and migration, and an increase in apoptosis. In suspension culture models, we determined that RUNX is involved in the generation of CSCs, as treating them with AI-10-104 prevented mammosphere formation and reduced the expression of stem cell markers.

The expression of *RUNX1* is increased after treatment of cell lines with therapeutic drugs such as paclitaxel and doxorubicin. Furthermore, its expression is higher in the suspended population (stem-like population) compared to the adherent population, and in paclitaxel-resistant cells compared to the control population. Reducing the transcriptional

activity of RUNX enhances cell sensitivity to these drugs, as the combination of these drugs with AI-10-104 significantly decreases viability and increases apoptosis compared to using the drugs or the inhibitor alone. This effect was also observed in mammospheres. Moreover, treating paclitaxel-resistant cells with AI-10-104 reversed the acquired resistance, as evidenced by modulation of the IC<sub>50</sub> value.

To explore the mechanism through which RUNX modulates drug sensitivity, we studied ABC transporters, known mediators that CSCs use to resist drug toxicity. Inhibiting the transcriptional activity of RUNX reduces the mRNA expression of *ABCC1* in both adherent and suspended models. These findings suggest that RUNX may be involved in generating chemotherapy resistance in TNBC cell lines by regulating the expression of this gene.

Finally, the glucocorticoid receptor (GR) has been identified as a necessary mediator for the generation of CSCs and paclitaxel resistance in human TNBC cell lines. In this study, we identified a potential DNA binding site for GRs in the promoter region of the *RUNX1* gene. TNBC cell lines treated with dexamethasone (GR agonist) showed increased mRNA expression of *RUNX1*, while treatment with mifepristone (GR antagonist) restored expression to basal levels. Thus, *RUNX1* could be externally regulated through GR activation.

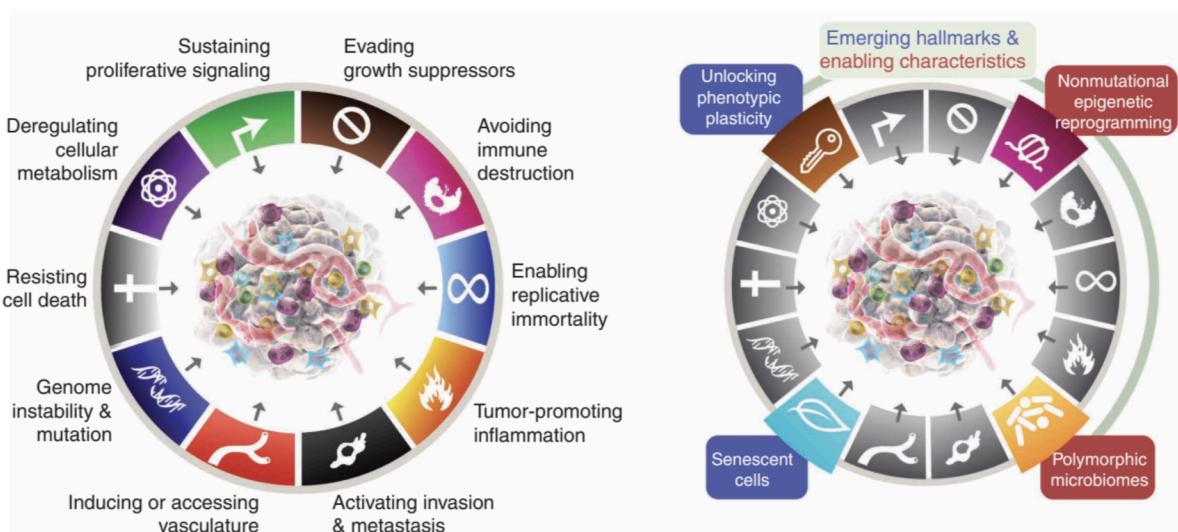
Based on all this information, we identify RUNX as an interesting therapeutic target for the treatment of TNBC patients.

**Key words:** TNBC, RUNX, chemotherapy resistance, CSC, GR.

# INTRODUCCIÓN

## I. Cáncer y proceso metastásico

Las características distintivas del cáncer, con respecto al tejido normal, impulsan la adquisición de capacidades funcionales que, en conjunto, permiten a las células cancerosas proliferar de manera expansiva mientras orquestan la formación de tumores que crecen y, con frecuencia, se diseminan. Estas características distintivas incluyen: mantener señales proliferativas, evadir supresores de crecimiento, impedir o evadir la respuesta inmune antitumoral, permitir la inmortalidad replicativa, promover la inflamación tumoral, activar mecanismos moleculares que promuevan la invasión y metástasis, inducir o acceder a la vasculatura, poseer inestabilidad genómica o mutaciones, resistir la muerte celular, desregular el metabolismo celular (Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2011) y la añadida recientemente, desbloquear la plasticidad fenotípica (Hanahan, D., 2022). Por otro lado, la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos constituyen características habilitadoras que facilitan la adquisición de estas capacidades mencionadas. Además, las células senescentes podrían sumarse a la lista de tipos celulares funcionalmente importantes en el microambiente tumoral (Hanahan, D., 2022) (**Figura 1**).



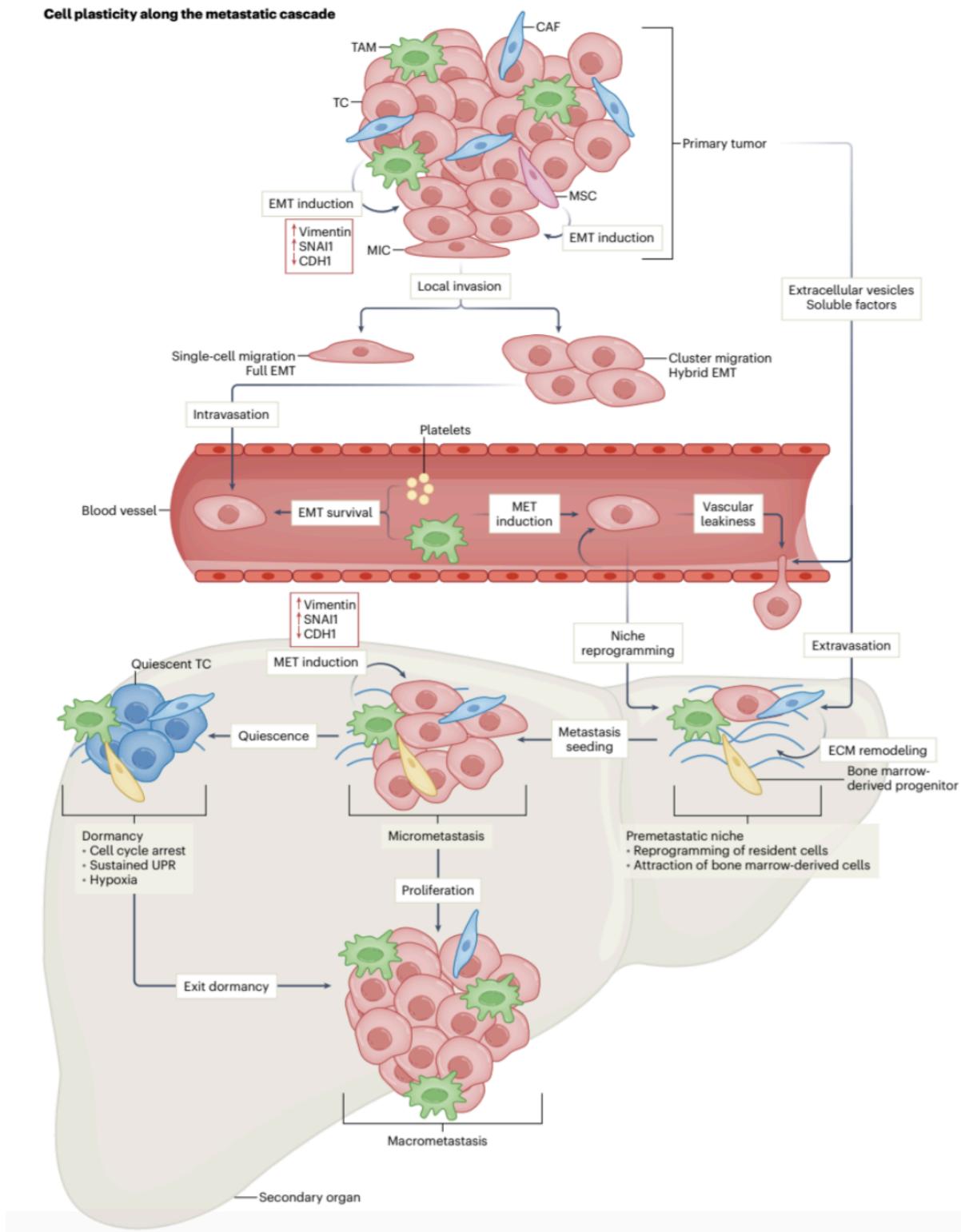
**Figura 1.** Del lado izquierdo se muestran las capacidades y características del cáncer descriptas en Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2011. Del lado derecho, las añadidas recientemente en Hanahan, D., 2022.

El cáncer representa una gran crisis para el sistema de salud; a nivel global, en 2020 hubo aproximadamente 18 millones de casos de cáncer, lo que resultó en 10 millones de muertes. Se estima que en la próxima década, la incidencia de cáncer aumentará a más de 27 millones, con más de 16 millones de muertes relacionadas con la enfermedad (Mahesh Koirala and Mario Di Paola, 2024). Si bien las tasas de supervivencia a 5 años han aumentado del 35 %

en la década de 1950 al 69.7 % en 2017 (SEER Cancer Statistics Review 1975–2018), el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Uno de los principales problemas para combatir el cáncer es la resistencia a los medicamentos, que sigue siendo un desafío en la práctica médica oncológica, limitando la eficacia de las terapias convencionales y dirigidas (Kumar and Bansala, 2024). Por esta razón, a pesar de los avances en los enfoques de tratamiento, los mecanismos de resistencia dificultan la eficacia terapéutica, promoviendo la recurrencia de la enfermedad y generando un mal pronóstico para los pacientes (Vasan, N. et al., 2019).

### ***Metástasis***

La diseminación es un proceso desafiante para las células cancerosas, dado que requiere una serie de eventos que permitan su supervivencia y crecimiento lejos del lugar de origen. La metástasis ocurre a través de una cascada de múltiples pasos (**Figura 2**), que incluye el desprendimiento de las células cancerosas del tumor primario, la migración celular, la invasión local al tejido circundante, la intravasación a través de la membrana basal hacia los vasos sanguíneos o linfáticos, la supervivencia en la circulación, la diseminación, la extravasación en sitios distantes y la colonización metastásica (Pérez-González et al., 2023).



**Figura 2.** Esquema de la cascada metastásica. Las células tumorales adquieren propiedades iniciadoras de metástasis a través de la inducción de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), que permite a las células iniciadoras de metástasis (MIC) despegarse del tumor primario. El nicho vascular facilita la intravasación de las MIC en el torrente sanguíneo, donde las células circulantes de tumor (CTC) individuales o en cluster interactúan con plaquetas y macrófagos que las protegen. El órgano secundario está preparado para recibir esa metástasis por el tumor primario a través de secreción de vesículas extracelulares y factores solubles, que crean un microambiente permisivo. Para colonizar el sitio metastásico, se

requiere que las células reviertan su estado mesenquimal a epitelial (MET) mediante señales provenientes del nicho metastásico. Las células tumorales pueden entrar en *dormancy*, que les confiere evasión inmune y resistencia a terapia; o proliferar y dar lugar a una metástasis macroscópica (Pérez-González et al., 2023).

A continuación se detallan los distintos eventos que ocurren durante dicha cascada metastásica:

**Formación del tumor primario:** La formación de un tumor primario es el resultado de la proliferación desregulada de células cancerosas en cualquier órgano o tejido, debido a una respuesta inapropiada a las señales intracelulares que controlan la división y el crecimiento celular normales. Esta propagación desregulada de células generalmente se basa en mutaciones que resultan en la activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores (Stratton et al., 2009). El órgano secundario es condicionado por el tumor primario mediante la liberación de vesículas extracelulares y factores solubles, creando así un microambiente favorable para la metástasis.

**Angiogénesis y linfangiogénesis:** Los tumores sólidos suelen inducir la formación tanto de vasos linfáticos como sanguíneos, promoviendo así la supervivencia y diseminación de las células cancerosas. La neoangiogénesis es principalmente un requisito para sobrevivir al entorno deficiente en nutrientes e hipóxico provocado por la división celular desregulada y el aumento del tamaño del tumor por encima de  $1 \text{ mm}^3$  (Hanahan & Folkman, 1996; Sherwood et al., 1971). La formación de la vasculatura es promovida por la expresión de factores de transcripción como el factor inducible por hipoxia (HIF) $\alpha$  y factores angiogénicos descendentes como el VEGF, cuya expresión se correlaciona con la metástasis del cáncer (Qing & Simon, 2009; Weis & Cheresh, 2011).

**Iniciación de la metástasis e invasión local:** Durante la invasión local, a través de un proceso denominado transición epitelio-mesenquimal (EMT por sus siglas en inglés *epithelial-mesenchymal transition*), las células tumorales pueden adquirir características mesenquimales como una mayor motilidad e invasión (Groves et al., 2023; Novikov, N. M. et al., 2021; Trepat, X. et al., 2012; Fanfone, D. et al., 2022). En las primeras etapas de EMT, las células cancerosas experimentan una transformación en la que pierden sus características epiteliales, como la adhesión intercelular y la polaridad, y adquieren características mesenquimales que les permiten desarrollar un fenotipo invasivo (Muscella, A. et al., 2020; Wan, G. et al., 2019; Thiery et al., 2009; J. Yang et al., 2020). Paralelamente, varios genes muestran cambios en su expresión, incluidos aquellos relacionados con la remodelación de la matriz extracelular (MEC), la organización del citoesqueleto y la adhesión celular.

(Bonnans, C. et al., 2014; Theocharis, A. D. et al., 2016; Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, 2016). A medida que el proceso de EMT avanza, las células cancerosas pueden experimentar cambios adicionales, como la activación de la capacidad *stem*, lo que puede llevar a la **heterogeneidad tumoral y a la resistencia al tratamiento**. El proceso de EMT también puede facilitar la formación de metástasis, ya que las células cancerosas con características mesenquimales tienen una mayor capacidad para invadir los tejidos vecinos y entrar en el torrente sanguíneo o el sistema linfático (Lambert, A. W. & Weinberg, R. A., 2021; Zhou, P. et al., 2017). Durante mucho tiempo, EMT se consideró un interruptor binario, pero estudios recientes han demostrado que las células tumorales sometidas a EMT presentan estados intermedios, parciales o híbridos que pueden transitar de uno a otro mientras coexpresan marcadores epiteliales y mesenquimales. Las células tumorales en un estado de EMT completo invaden los tejidos circundantes como células mesenquimales individuales, mientras que los estados híbridos de EMT promueven la migración colectiva, con células tumorales en el borde de ataque que presentan un fenotipo EMT más pronunciado en comparación con las células seguidoras (Aiello, N. M. et al., 2018). Las células híbridas de EMT que migran de manera colectiva están asociadas con la plasticidad, la capacidad *stem*, la invasión y una mayor capacidad metastásica (Pastushenko, I. et al., 2018; Lüönd, F. et al. 2021). Estos fenotipos adquiridos por plasticidad celular promueven la heterogeneidad fenotípica dentro de los tumores (M. S. Brown et al., 2022). Dentro de la conocida heterogeneidad fenotípica de los tumores, existe un subconjunto de células indiferenciadas (Singh & Settleman, 2010). Algunos grupos de investigación consideran que estas células cancerosas potencialmente metastásicas son **células madre tumorales** (CSCs, por sus siglas en inglés *cancer stem cells*), ya que poseen propiedades de autorrenovación e iniciación tumoral que les permitirían, en última instancia, formar tumores secundarios (Cho & Clarke, 2008; Khan et al., 2022; Lobo et al., 2007; Singh & Settleman, 2010). Evidencia creciente indica que solo ciertas subpoblaciones de células tumorales, denominadas células iniciadoras de metástasis (MICs, por sus siglas en inglés *metastasis initiating cells*), son capaces de formar metástasis (Gkountela, S. & Aceto, N., 2016). Las MICs pueden originarse a partir de CSCs o generarse mediante la desdiferenciación de células no CSC. Por lo tanto, las células cancerosas pueden emplear programas embrionarios, como EMT, para generar CSCs.

**Intravasación y supervivencia en circulación:** A continuación, las células tumorales intravasan los vasos sanguíneos como **células tumorales circulantes** (CTCs, por sus siglas en inglés *circulating tumor cells*) (Majidpoor, J. & Mortezaee, K., 2021). Las células

cancerosas que intravasan sufren una expresión aumentada de integrinas y otras moléculas de adhesión, para facilitar la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales vasculares (Friedl & Wolf, 2003). Mientras que la mayoría de las CTCs son células individuales en circulación, una fracción menos prevalente viaja en clusters. A diferencia de las CTCs individuales, la migración de los cluster de CTCs muestra una mayor resistencia a la anoikis (muerte celular programada que ocurre cuando una célula pierde contacto con la matriz extracelular), lo cual probablemente se deba al mantenimiento de los contactos célula-célula (Yadav et al., 2015; Fabisiewicz, A. & Grzybowska, E., 2017). Estos clusters se forman a través de interacciones homotípicas entre células tumorales o interacciones heterotípicas que involucran otros tipos celulares, como plaquetas o células mieloides (Obenauf, A. C. & Massague, J., 2015). La formación de estos clusters no sólo impulsa la proliferación y supervivencia de las CTCs en el torrente sanguíneo, sino que también mejora su eficiencia metastásica al facilitar la evasión inmunitaria y la capacidad de colonización en sitios distantes, asociándose con un mal pronóstico (Aceto, N. et al., 2015; Wang, C. et al., 2017; Costa, C. et al., 2020). Tanto las CTCs individuales como los cluster exhiben cambios en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales, mostrando plasticidad durante la progresión tumoral. Mientras que las células epiteliales que intravasan los vasos sanguíneos normalmente sufren anoikis porque pierden las señales de supervivencia dependientes de la adhesión, el proceso de EMT permite que células tumorales individuales cambien su destino hacia un fenotipo mesenquimal, en el cual las señales de supervivencia independientes de la adhesión previenen la muerte celular (Castro-Giner, F. & Aceto, N., 2020). Además, la supervivencia de las CTCs se beneficia con la adquisición de características *stem* durante EMT, lo que promueve habilidades migratorias e invasivas, así como resistencia a la terapia (Adorno-Cruz, V. et al., 2015). Las CTCs con propiedades *stem* se identifican como cruciales para una diseminación metastásica exitosa debido a su heterogeneidad fenotípica (Zhu, L. et al., 2020). Las CTCs que son viables en el torrente sanguíneo tienen el potencial de arrestarse en varios lugares, incluidos los sitios metastásicos secundarios o nuevos lugares distantes (Genna, A. et al., 2020; Silva Paiva, R. et al., 2020; D'Oronzo, S. et al., 2017; Majidpoor, J. & Mortezaee, K., 2021). Una vez detenidas, estas CTCs pueden experimentar una transición mesenquimal-epitelial (MET, por sus siglas en inglés *mesenchymal epithelial transition*), lo que puede facilitar la extravasación. Se ha demostrado que el recuento de CTCs está asociado con una disminución de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal (Cohen SJ et al., 2009; Cristofanilli M et al., 2004; de Bono JS et al., 2008; Krebs MG et al., 2011). La

Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) aprobó el recuento de CTC para su uso clínico de pronóstico. Sin embargo, aún se desconoce si el recuento de CTC podría utilizarse como alternativa a la evaluación clínica para guiar la elección de tratamiento para lo cual hay actualmente ensayos clínicos realizándose (Bingzhen Li and Ying Zheng., 2021).

Extravasación y colonización metastásica: Las proteínas de membrana en la superficie tumoral desempeñan un papel clave en la extravasación. Varias integrinas en las células cancerosas están involucradas en este proceso, incluyendo su adhesión y transmigración a través del endotelio, así como su unión a la matriz estromal que rodea los vasos sanguíneos (Osmani et al., 2019). Tras la extravasación e infiltración en el sitio secundario, se inicia la MET (por sus siglas en inglés *mesenchymal epithelial transition*), que requiere la reactivación de factores epiteliales y la supresión de los mesenquimales, y a través de la cual las células recuperan su carácter epitelial para proliferar y diferenciarse en diferentes tumores secundarios o metastásicos (Nieto, 2013). Para permitir el crecimiento progresivo de las metástasis, el *switch* angiogénico y la evasión inmunitaria son esenciales. Aunque la proliferación de las células cancerosas puede activarse sin un *switch* angiogénico, la falta de vasculatura conduce a apoptosis, lo que impide el crecimiento general del tumor y mantiene las micrometástasis en *dormancy* (Holmgren et al., 1995; Naumov et al., 2006).

Latencia tumoral o *Dormancy*: Está bien establecido que el crecimiento de células metastásicas en un microambiente tisular extraño es un proceso altamente ineficiente y se considera el paso limitante de la metástasis en el cáncer de mama (Valastyan S. et al., 2011). Las células diseminadas que sobreviven a las señales adversas en su nuevo entorno a menudo permanecen en estado de quiescencia en órganos secundarios durante períodos prolongados, conocido como el período de latencia (en inglés *dormancy*) (Giancotti FG., 2013). El *dormancy* celular en CTCs y células cancerosas metastásicas ha sido caracterizada como un proceso potencialmente reversible definido por la inhibición de la proliferación y la entrada en un estado quiescente, donde las células permanecen en la fase G0/G1 del ciclo celular pero siguen siendo viables y metabólicamente activas (Marlow et al., 2013; Spiliotaki et al., 2014; Truskowski K. et al., 2023; Min HY. et al., 2023). Este estado permite que las células cancerosas soporten períodos prolongados en condiciones adversas, incluidas aquellas inducidas por terapias contra el cáncer, o la mala vascularización, destrucción inmunitaria, falta de nutrientes y factores de crecimiento o señales inhibitorias del

microambiente (Holmgren, L. et al., 1995; Koebel, C. M. et al., 2007; Bragado, P. et al., 2013; Miller AK et al, 2021).

Las células en estado de *dormancy* suelen mostrar resistencia a las terapias convencionales, las cuales están dirigidas principalmente a células de división activa y rápida (Damen MPF et al., 2021). Esta resistencia se debe, en parte, a su estado quiescente haciéndolas menos susceptibles a los mecanismos de acción empleados por estos tratamientos, permaneciendo indetectables mediante técnicas de imagen, y siendo finalmente responsables de la recaída, incluso varios años después de la remisión clínica (Massagué, J. & Ganesh, K., 2021). Diversos factores, como la restauración del suministro sanguíneo o las alteraciones en la matriz extracelular (del inglés *extracellular matrix* o ECM), pueden desencadenar la reactivación de células en estado de *dormancy*. Esta reactivación suele estar acompañada de la sobreexpresión de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la división celular y las vías de supervivencia (Butturini E. et al., 2019). Además, la unión de integrinas y otros receptores de superficie en las células cancerosas en *dormancy* a componentes específicos de la ECM puede activar cascadas de señalización que impulsan la reentrada en el ciclo celular (Park SY, Nam JS, 2020). Los estudios de transcriptómica de célula única y modelos de organoides del estroma tumoral muestran que estas células cancerosas reactivadas presentan una mayor capacidad de autorrenovación, resistencia a la quimioterapia y un microambiente tumoral alterado, caracterizado por un aumento en la señalización inmune protumoral (Muhammad Tufail et al., 2025). Comprender los mecanismos moleculares que “despiertan” a las células tumorales de este estado de latencia es un campo en constante crecimiento.

Después de comprender el recorrido que debe realizar un grupo de células para llegar a formar exitosamente una metástasis, surgen varios puntos para tratar esta patología:

- Bloquear el proceso de **EMT**.
- Mantener las células cancerosas en un estado de ***dormancy*** para evitar el crecimiento metastásico.
- Evitar la **plasticidad fenotípica**: Durante la progresión del cáncer, las células tumorales pueden alternar entre diferentes estados celulares, un proceso principalmente mediado por la plasticidad celular, para superar las presiones selectivas. Por lo tanto, la plasticidad celular es un factor clave en la heterogeneidad intratumoral y en la capacidad de adaptación de las células tumorales, lo que

favorece su crecimiento, metástasis y resistencia a la terapia (Pérez-González, A. et al., 2023).

- Eliminar la población de **CSCs**.
- Atacar las células **resistentes a la terapia** (desarrollado en la sección “*Quimioresistencia*”).

### ***Heterogeneidad tumoral***

El cáncer es una enfermedad dinámica que evoluciona constantemente durante el curso de la enfermedad. A medida que progresan, los tumores suelen volverse más heterogéneos, lo que da lugar a una colección diversa de subpoblaciones celulares dentro del tumor primario, cada una con firmas moleculares distintas. Estas células tienen diferente morfología e índice proliferativo, son genéticamente variables y presentan variaciones en la sensibilidad a los medicamentos contra el cáncer (Makena MR et al., 2020), lo que aumenta las probabilidades de la existencia de subpoblaciones tolerantes y resistentes a los tratamientos empleados (Andriy Marusyk et al., 2020).

La heterogeneidad actúa como combustible para la resistencia a la terapia; por lo tanto, **una evaluación precisa de la génesis de esta característica es fundamental para desarrollar terapias efectivas**. En la actualidad se conoce que puede generarse a partir de cambios genéticos, transcriptómicos, epigenéticos y/o fenotípicos, contribuyendo así a la complejidad y resistencia del tumor (Ibiay Dagogo-Jack and Alice T. Shaw, 2018).

A nivel poblacional, la heterogeneidad tumoral puede dividirse en dos categorías principales: heterogeneidad intertumoral o intratumoral. En esta tesis se hace referencia a la intratumoral, que refleja las diferencias entre las células tumorales dentro de un mismo paciente. La heterogeneidad intratumoral, impulsada por la variabilidad genómica debido a factores como la exposición a mutágenos, la disfunción en la reparación del ADN y las alteraciones en el equilibrio redox, desempeña un papel crucial en la progresión del cáncer y la resistencia a los medicamentos (Huang, R., & Zhou, P. K., 2021; Khan, S. U. et al., 2022). La heterogeneidad intratumoral puede clasificarse de las siguientes maneras:

**Heterogeneidad espacial**: describe la distribución desigual de subpoblaciones tumorales genéticamente diversas a través de diferentes sitios de la enfermedad o dentro de un único sitio o tumor.

Heterogeneidad temporal: abarca las variaciones dinámicas en la diversidad genética de un tumor individual a lo largo del tiempo.

El muestreo multirregional, que consiste en la obtención de biopsias de múltiples regiones dentro de una sola lesión tumoral, es una estrategia de investigación integral que mejora significativamente la capacidad para determinar el alcance de la heterogeneidad espacial dentro de un tumor individual (Yates, L. R. et al., 2015). Sin embargo, el estado clínico del paciente y la ubicación de las lesiones en progresión pueden dificultar la realización de biopsias tisulares repetidas. Además, los análisis basados en muestras de biopsias de un único sitio pueden subestimar la magnitud de la heterogeneidad espacial y el repertorio mutacional, y los intervalos de muestreo que el paciente puede tolerar podrían no reflejar con precisión el alcance real de la heterogeneidad temporal (Shang, M. et al., 2018). En este contexto, las **biopsias líquidas no invasivas** representan una estrategia prometedora para superar las limitaciones del muestreo tisular tradicional (Wan, J. C. M. et al., 2017). Estas biopsias permiten realizar análisis de material genético derivado del tumor, extraído de la sangre del paciente. El genotipado de material genético obtenido a partir de CTCs, exosomas circulantes liberados por los tumores, y ADN tumoral circulante (DNAct) ha mostrado resultados alentadores en varios tipos de tumores sólidos debido a la utilidad de la evaluación para detectar, por ejemplo, mutaciones que pueden tener implicancia en resistencia a la terapia. Las biopsias líquidas tienen el potencial de ser una herramienta clínica para el diagnóstico del cáncer, la estratificación terapéutica y el monitoreo del tratamiento, evitando la necesidad de muestreo directo del tumor. (Oxnard, G. R. et al., 2016; Chabon, J. J. et al., 2016; San Lucas, F. A. et al., 2016; Sundaresan, T. K. et al., 2016).

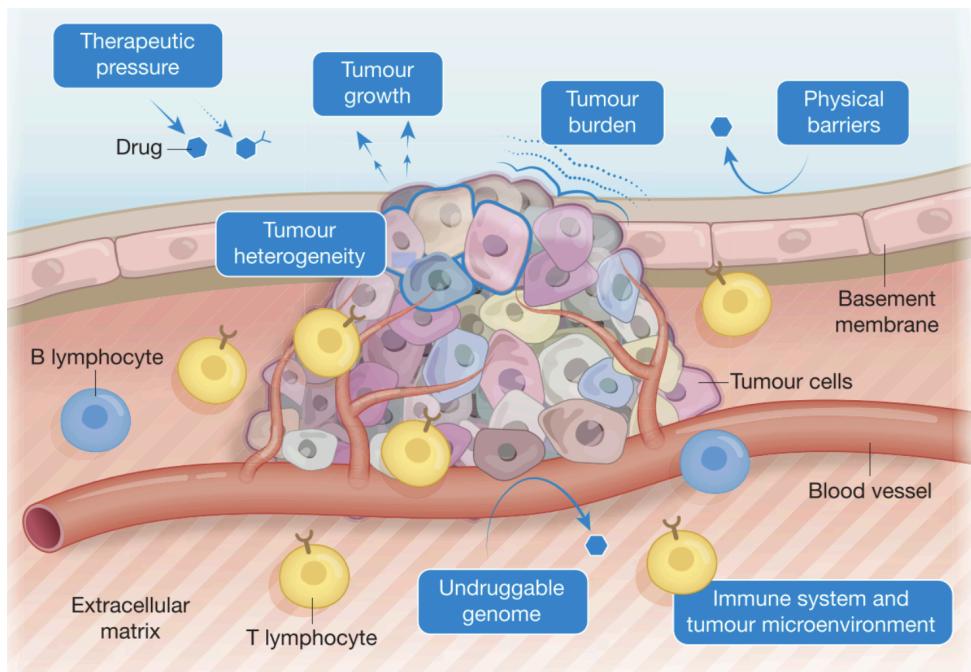
### *Quimioresistencia*

Ha sido reportado que la quimioterapia desempeña un papel activo en la generación de células resistentes: esta subpoblación celular muestra una mayor expresión de genes de respuesta al estrés, suelen caracterizarse por un estado quiescente o de ciclo lento y, al reactivarse, dan lugar a tumores más difíciles de controlar que el anterior (Huang S., 2021; De Angelis, M. L. et al., 2019). A pesar de las respuestas favorables iniciales del tumor, la resistencia surge casi inevitablemente en los tumores metastásicos. En muchos casos de recaídas clínicas, la resistencia está asociada a mutaciones genéticas específicas, como la amplificación genómica del blanco terapéutico, mutaciones puntuales que reducen alostéricamente la capacidad del fármaco para bloquear la actividad enzimática o la amplificación/mutación de otros genes que permiten a las células tumorales mantener la

señalización oncogénica (Lovly y Shaw, 2014). La mayoría de estos cambios mutacionales en el ADN se consideran suficientes para conferir resistencia completa, lo que subyace a las recaídas clínicas (Lovly y Shaw, 2014). Sin embargo, en otros casos no se pudieron identificar factores genéticos conocidos. Aunque es posible que la resistencia en estos casos se atribuya a mutaciones no caracterizadas, un creciente cuerpo de evidencia experimental sugiere que la resistencia puede surgir a través de mecanismos epigenéticos, involucrando cambios en la expresión génica mediados por la remodelación de la cromatina (Hinohara et al., 2018; Knoechel et al., 2014; Liau et al., 2017; Risom et al., 2018; Sharma et al., 2010; Shu et al., 2016). Un subconjunto de células cancerígenas puede evitar la eliminación terapéutica al entrar en un estado de células persistentes tolerantes a los medicamentos (o DTP, por sus siglas en inglés *drug tolerant persistent*) mediante una reprogramación transcripcional (Sharma, S. V. et al., 2010; Shaffer, S. M. et al., 2017; Oren, Y. et al., 2021). Aunque dicho estado tolerante a los medicamentos puede ser inicialmente reversible, con una exposición prolongada al fármaco, los estados adaptativos heredables pueden eventualmente conferir resistencia estable (Brock, A. et al., 2009; Pisco, A. O. et al., 2013; Gustavo S. França et al., 2024). Las células DTP sobreviven pero no proliferan durante el tratamiento, y su progenie sigue siendo sensible al tratamiento después de la retirada del fármaco (Shen, S. et al., 2020; Marine, J.-C. et al., 2020).

Además de modificaciones genéticas y epigenéticas, hay otros mecanismos de resistencia a drogas en esta patología (**Figura 3**). Algunos de ellos son: barreras físicas que dificultan el flujo sanguíneo disminuyendo la exposición efectiva del tumor a la droga (Vasan, N. et al., 2019); el sistema inmunológico y microambiente tumoral impidiendo la eliminación inmunitaria de las células tumorales, obstaculizando la absorción de medicamentos y estimulando factores de crecimiento parácrinos que promueven el crecimiento de las células cancerígenas (Sharma, P. et al., 2017); alteraciones del blanco terapéutico que resultan de mutaciones secundarias en la proteína o de modificaciones epigenéticas que incrementen la expresión de dicha proteína (Mahesh Koirala and Mario Di Paola, 2024); la presión terapéutica que aumenta la inestabilidad genómica, con efectos masivos y generalizados tanto en las células cancerosas supervivientes como en las células no cancerosas. Además, pueden inducir respuestas inmunitarias en el huésped que atenúan las respuestas antitumorales, lo que podría comprometer la eficacia del tratamiento (Alexandrov, L. B. et al., 2013; Glen, C. D. & Dubrova, Y. E., 2012). Las presiones de selección de la quimioterapia fomentan además la evolución de subclones resistentes (Hata, A. N., 2016). La heterogeneidad tumoral (descripto en la sección **Heterogeneidad tumoral**) como

promotor de la resistencia a drogas es el punto clave de esta tesis: la evolución del tumor genera una subpoblación de células con resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés *multi-drug resistance*) que presentan respuestas diferentes al tratamiento en comparación con las células primarias (Andriy Marusyk et al., 2020).



**Figura 3.** Determinantes biológicos de la resistencia a fármacos (Figura extraída de Neil Vasan et al., 2019).

A continuación se explican los procesos biológicos responsables de generar resistencia a drogas abordados en esta tesis:

**Transporte de drogas:** Este proceso implica el movimiento activo de fármacos fuera de las células cancerígenas, lo que conduce a una reducción en la concentración intracelular de los fármacos anticancerígenos a niveles subletales, lo que resulta en un tratamiento ineficaz. La expulsión de fármacos es impulsada principalmente por una familia de proteínas conocidas como transportadores ATP-binding cassette (ABC). Los transportadores ABC utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar activamente diversas moléculas, incluidos los fármacos anticancerígenos, a través de las membranas celulares contra sus gradientes de concentración (Pérez-De Marcos et al., 2021; Wang J-Q et al., 2021). La expresión y actividad de los transportadores ABC son típicamente altas en ciertos tejidos como mecanismo de protección contra toxinas. Sin embargo, en las células cancerígenas, la

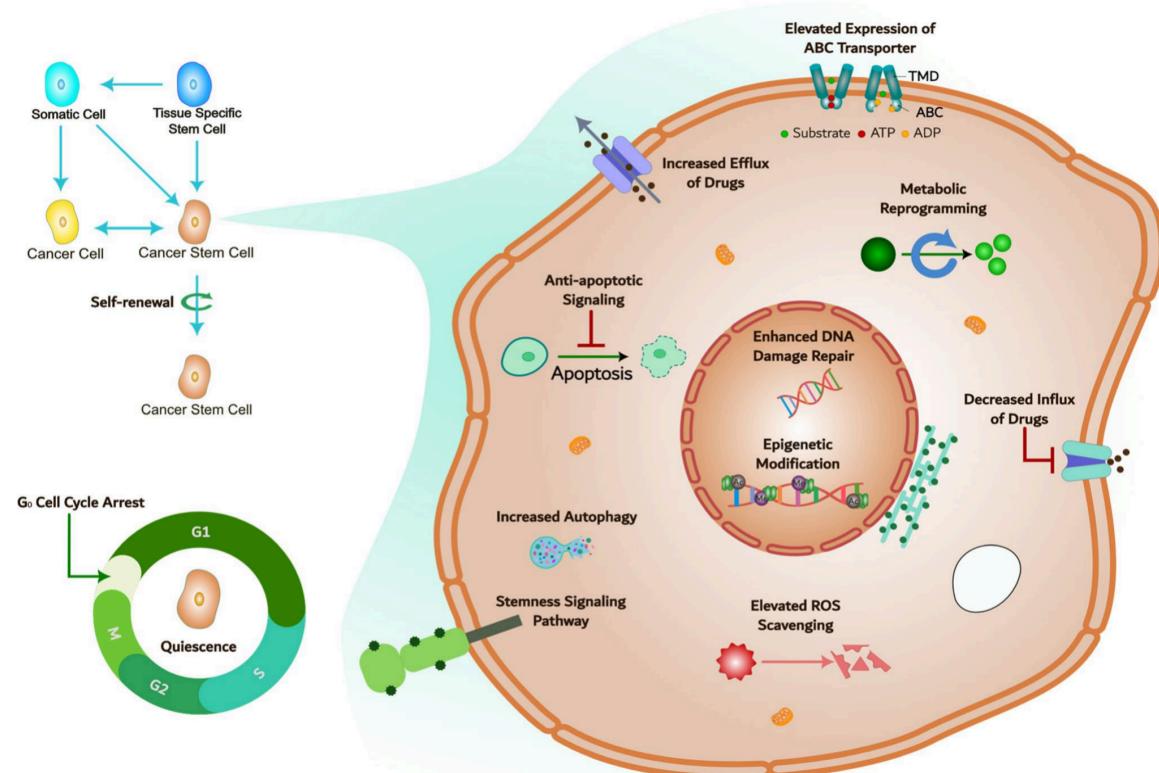
sobreexpresión o el aumento de la actividad de estos transportadores pueden generar desafíos significativos en el tratamiento, ya que eliminan eficazmente los agentes terapéuticos de las células antes de que puedan ejercer sus efectos citotóxicos (Wang J-Q et al., 2021). Los transportadores Glicoproteína-P (**P-gp**/MDR1/ABCB1), Proteína asociada a resistencia multi-droga (MRPs/**ABCCs**), y Proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP/**ABCG2**) son los principales contribuyentes a la resistencia multidrogas (MDR por sus siglas en inglés *multidrug resistance*) en la quimioterapia del cáncer (Wang, F. et al., 2020). De hecho, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de *MDR1* está implicado en la resistencia a los fármacos en diferentes tipos de cáncer, incluidos los de colon, pulmón, mama y próstata, entre otros (Nooter, K. et al., 1997; Thomas, H. et al., 2003; Triller, N. et al., 2006; Zalcberg, J. et al., 2000). Se ha asociado la reducción de las respuestas a la quimioterapia y un mal pronóstico en diversos tipos de cáncer, con una mayor expresión de P-gp en las células cancerígenas. La leucemia mieloide aguda y el cáncer de mama son dos ejemplos de malignidades con bajos niveles de expresión de P-gp de forma basal, que presentaron una sobreexpresión de P-gp a medida que la enfermedad progresaba después de recibir quimioterapia (Waghray, D. et al., 2018). La función activa de expulsión de fármacos de P-gp mostró ser un mecanismo clave de defensa contra la resistencia en el cáncer de ovario, y la disminución de P-gp demostró restaurar la sensibilidad de las células tumorales a paclitaxel (Wu, J. et al., 2021).

**Células madre tumorales o *cancer stem cells (CSCs)*:** Las CSCs tienen la capacidad de generar poblaciones heterogéneas de células cancerosas gracias a su potencial de autorrenovación y diferenciación (Phi LTH et al., 2018, Marusyk, A., 2020, Yang L 2020, Bhat G 2024). Estas células pueden originarse a partir de células madre normales que se vuelven tumorales debido a cambios genéticos o ambientales (Yu Z. et al., 2012). Una teoría alternativa sugiere que las células normales diferenciadas se transforman en células cancerosas con propiedades similares a las de las células madre (Yu Z. et al., 2012). Otros proponen que la plasticidad epigenética, a menudo representada en el proceso de EMT, está implicada en la generación de CSCs (Brabietz T. et al., 2018).

Varios estudios han demostrado que las CSCs se enriquecen después de la quimioterapia o la radioterapia, lo que sugiere que la terapia induce o selecciona células cancerosas con propiedades de CSC (Nassar D et al., 2016). Las CSCs poseen mecanismos de resistencia endógena en un grado mucho mayor que las células tumorales normales, los cuales pueden observarse en la **Figura 4** (Tahsin Nairuz et al., 2023). Estos mecanismos incluyen la desregulación de las vías apoptóticas y la sobreexpresión de mecanismos de supervivencia en

las células cancerosas (Fulda, S., 2015; Kof, J. L. et al., 2015), la elevada actividad de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Xu, X., et al., 2015), el aumento en la producción de transportadores ABC (An, Y., & Ongkeko, W. M., 2009; Dean, M. 2009; Xu, F., et al., 2014), la expresión elevada de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL (Wang, Y. H., & Scadden, D. T., 2015), la capacidad para reparar el daño en el ADN mediante puntos de control como CHK1 y CHK2 (Bao, S., et al., 2006), así como la activación de componentes esenciales de señalización de supervivencia (Ramasamy, T. S., et al., 2015; Todaro, M., et al., 2010).

Investigaciones recientes han demostrado que las CSCs permanecen en estado de quiescencia en el período de reposo del ciclo celular (fase G0), lo que las hace resistentes a la quimioterapia, ya que la mayoría de los medicamentos quimioterapéuticos están dirigidos a células en división, que están proliferando activamente (Luo M., & Wicha M. S., 2019; Snyder V., et al., 2018). Con respecto a los transportadores ABC, en las CSCs del cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés *triple negative breast cancer*), la sobreexpresión de ABCG2 está asociada con quimiorresistencia. Además, se ha encontrado que ABCG2 protege a diferentes células cancerosas contra 5-FU y doxorrubicina al expulsar estos medicamentos e inhibir la apoptosis (Eldaly, S. et al., 2022; Hsu, H. H. et al., 2018).



**Figura 4.** Representación de la resistencia terapéutica del cáncer mediada por CSCs (Tahsin Nairuz et al., 2023).

En esta tesis doctoral, el enfoque de estudio estuvo dirigido específicamente al **cáncer de mama**, con un énfasis particular en el **cáncer de mama triple negativo (TNBC)**.

## II. Cáncer de mama

### *Incidencia*

La distribución de los casos de cáncer en Argentina según los principales sitios tumorales muestra que el cáncer de mama, con 22.024 casos, fue el de mayor incidencia en el año 2020 y es el primero en mujeres, lo que representó el 32,1% de todos los tumores malignos en este grupo. En el año 2022 se registraron 5.750 defunciones en mujeres por cáncer de mama, que corresponde a una tasa bruta de 24,4 defunciones cada 100.000 mujeres.

(<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>). El cáncer de mama es un problema global: es el cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres, con un estimado de 2.3 millones de nuevos casos y más de 685,000 muertes reportadas en 2020 (Sung et al., 2021). Aunque la tasa de supervivencia ha mejorado significativamente en las últimas dos décadas, la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando en todo el mundo. El aumento en la sobrevida se atribuye en gran medida a la detección mediante mamografías y a las terapias adyuvantes (Hashim et al., 2016). Una combinación de factores genéticos y no genéticos influye en la incidencia del cáncer de mama. Aproximadamente el 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios y están asociados con antecedentes familiares, aunque esto varía con frecuencia según la etnia y entre países (Shiovitz, S. & Korde, L. A., 2015). Entre los factores no genéticos se incluyen la edad, los factores de riesgo reproductivo (por ejemplo, menarca temprana y menopausia tardía), las hormonas femeninas exógenas, mayor edad materna al tener el primer embarazo, la falta de lactancia materna, factores relacionados con el estilo de vida (como la obesidad postmenopáusica y el consumo de alcohol), la exposición a radiación, la alta densidad mamográfica y la presencia de lesiones histológicas como la hiperplasia atípica (Sung et al., 2021). Sin embargo, algunos de estos factores también pueden estar relacionados con una predisposición genética (Danaei et al., 2005; Hankinson et al., 2004). El exposoma está subutilizado en la investigación del cáncer a pesar de su potencial para desentrañar las complejas relaciones entre las exposiciones ambientales y el cáncer, así como para orientar la prevención primaria (Young AS et al., 2025). La incidencia varía a nivel mundial, siendo más alta en las regiones de altos ingresos (92 por cada 100.000 en América del Norte) que en las regiones de bajos ingresos (27 por cada 100.000 en África central y Asia oriental) (Torre,

L. A. et al., 2016, Ginsburg, O. et al., 2017). Estos patrones reflejan tanto los factores de riesgo como la disponibilidad y el uso de mamografías (y, por lo tanto, los cánceres de mama detectados). Además, en los países de altos ingresos, el cáncer de mama suele diagnosticarse en una etapa temprana y el pronóstico suele ser favorable. Sin embargo, en los países de ingresos bajos y medianos, el cáncer de mama a menudo se diagnostica en etapas más avanzadas y, en consecuencia, está asociado con una menor supervivencia (Allemani, C. et al., 2015)— un hecho que se refleja en las estadísticas de mortalidad. Las diferencias en los patrones epidemiológicos del cáncer de mama entre países se ven además influenciadas por factores culturales, estilos de vida y campañas nacionales de concienciación (Colditz, G. A. et al., 2006). También influye el acceso a la salud de cada país, y la calidad de su sistema de salud.

### **Clasificación**

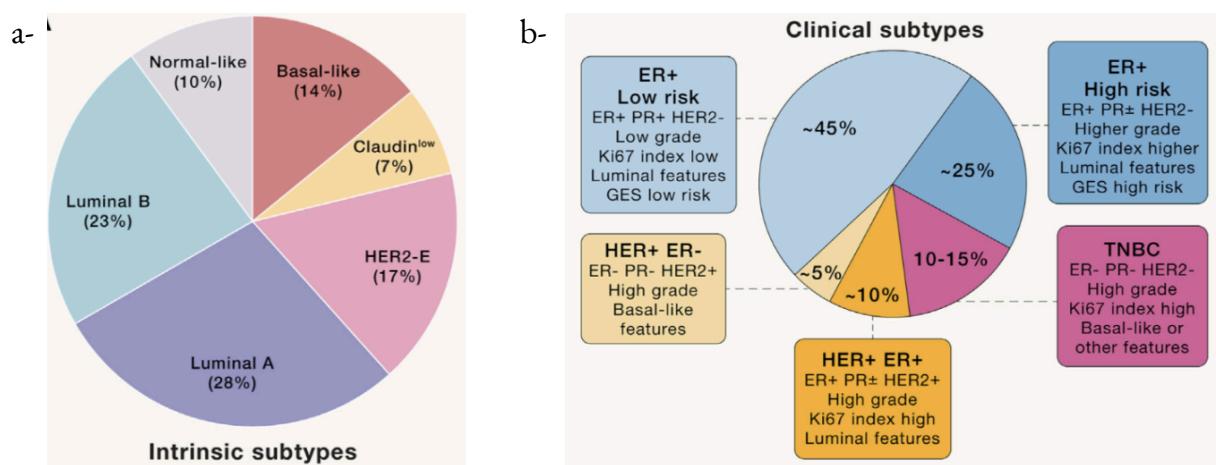
La primera clasificación molecular en el cáncer de mama se realizó a partir de muestras de pacientes y se basó en sus perfiles de expresión génica con microarrays (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Sørlie et al., 2003; Herschkowitz et al., 2007). Esto dio lugar a cinco subtipos moleculares intrínsecos de tumores de mama: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, *basal-like* y *claudin-low*, cada uno con características biológicas, pronósticas y clínicas únicas (Nolan et al., 2023) (**Figura 5a**).

- **Tumores luminal A:** Suelen ser de bajo grado, ER+ (ER por sus siglas en inglés *estrogen receptor*) PR+ (PR por sus siglas en inglés *progesterone receptor*), y expresan una fuerte firma génica luminal que incluye ESR1, GATA3, XBP1 y FOXA1. Estos tumores muestran una mayor supervivencia libre de recaída y supervivencia global tras el tratamiento en comparación con otros subtipos de cáncer de mama.
- **Tumores luminal B:** También son ER+ pero exhiben una menor expresión de genes luminales (por ejemplo, PGR) y una mayor expresión de genes de proliferación.
- **Tumores HER2-enriquecidos (HER2-E):** Representan del 15% al 20% de los casos de cáncer de mama y se distinguen por la amplificación de HER2/ERBB2 en el cromosoma 17q12 y una expresión intermedia de la firma génica luminal.
- **Tumores basal-like:** Representan el 15% de los casos y son altamente proliferativos, con una expresión aumentada de citoqueratinas basales y EGFR, además de una baja expresión de la firma luminal A. Estos tumores se caracterizan por una alta

instabilidad cromosómica y tienen una fuerte asociación con mutaciones germinales de BRCA1.

- **Tumores claudin-low:** Son el subtipo menos frecuente y suelen ser triple negativos. Muestran baja expresión de marcadores de proliferación, proteínas de adhesión y genes de diferenciación luminal. Este perfil muestra un enriquecimiento de características mesenquimales y un infiltrado de células inmunitarias. También presentan una baja sensibilidad a la quimioterapia (Prat *et al.*, 2010).

Estos subtipos fueron asociados a una distinta progresión de la enfermedad según análisis de supervivencia global y de supervivencia libre de metástasis siendo los tumores luminales de mejor pronóstico y los basales de peor pronóstico (Sørlie *et al.*, 2001; Sørlie *et al.*, 2003). Actualmente, los tumores de mama se estratifican clínicamente según la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/ERBB2) en tres grupos clínicos amplios: ER<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> y triple negativo (TNBC). Los tumores ER<sup>+</sup> pueden estratificarse en alto riesgo (comúnmente llamado Luminal B) o bajo riesgo (comúnmente llamado Luminal A), dependiendo del grado tumoral y la proliferación (marcación Ki67). Los tumores HER2<sup>+</sup> pueden subdividirse según la expresión de ER, identificando tumores con características moleculares y pronósticas distintas (Nolan *et al.*, 2023) (**Figura 5b**).



**Figura 5.** a- Gráfico que representa la frecuencia de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. b- Comparación de los principales subtipos clínicos de cáncer de mama, basada principalmente en características histológicas y en la expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación Ki67. (Nolan *et al.*, 2023).

Ya que las diferencias en los patrones de expresión génica reflejan diferencias básicas en la biología celular de los tumores, uno podría considerar a estos subtipos moleculares como enfermedades distintas. De hecho, uno de los grandes desafíos que enfrentan oncólogos e investigadores es que el cáncer de mama no es una entidad única sino un grupo heterogéneo de varios subtipos que manifiestan diferencias en su comportamiento biológico y clínico. Una meta fundamental para el tratamiento de esta enfermedad es la individualización del enfoque terapéutico, basado en un entendimiento detallado del perfil molecular de cada tumor y del resultado clínico probable en cada caso particular (Dawson S.J., et al., 2013). La medicina de precisión ofrece la promesa de tratamientos altamente individualizados, en los que cada paciente con cáncer de mama recibe los diagnósticos y terapias dirigidas más apropiados, basados en el perfil genético del tumor (Sarhangi et al., 2023).

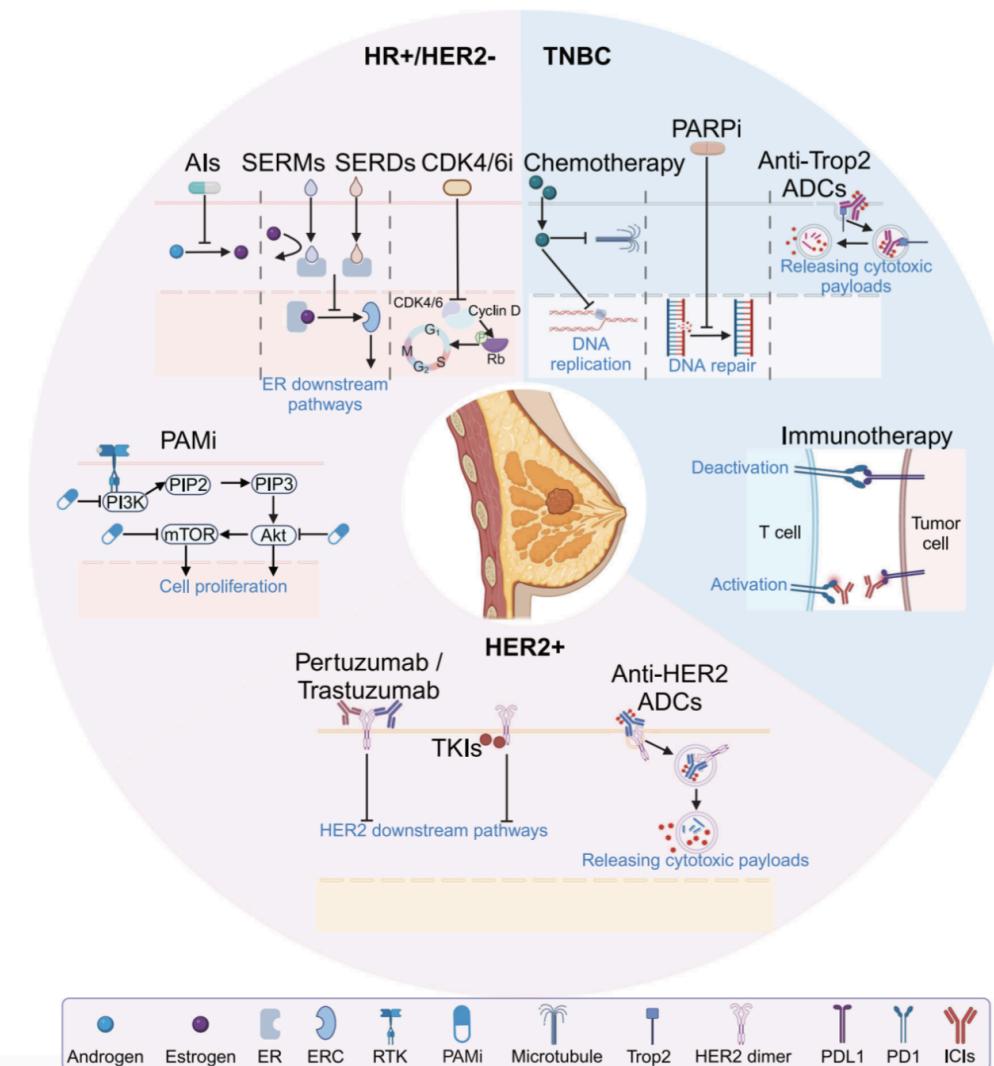
### ***Pronóstico y tratamiento***

En estadíos tempranos, es decir cuando el tumor está contenido en la mama o se extendió únicamente a los ganglios linfáticos axilares, se considera curable (Harbeck *et al.*, 2019; S. Loibl *et al.*, 2023). Por el contrario, en estadíos avanzados, es decir cuando el tumor mamario ya es inoperable o metastatiza y forma tumores secundarios en otras partes del cuerpo, no se considera curable con las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad (Cardoso *et al.*, 2024). Sin embargo es una enfermedad tratable, donde los objetivos terapéuticos principales son prolongar la supervivencia y controlar los síntomas, con una baja toxicidad asociada al tratamiento, para mantener o mejorar la calidad de vida (Harbeck *et al.*, 2019).

Los factores pronóstico más importantes en el cáncer de mama son la expresión de ER/PR, HER2 y marcadores de proliferación (por ejemplo, Ki67), el número de ganglios linfáticos regionales afectados, la histología del tumor, su tamaño, grado y la presencia de invasión vascular peritumoral (Loibl *et al.*, 2023). La clasificación intrínseca (**Figura 5a**) influye en el perfil (momento y sitios) de la enfermedad metastásica. Los tumores luminal A tienden a recaer tarde (después de 5 años desde su primera manifestación) y tienen un tropismo hacia el hueso y los ganglios linfáticos (al igual que los tumores luminal B HER2-negativos). Los TNBC son propensos a recurrencias tempranas (dentro de los 2 a 3 años desde su primera manifestación) y suelen formar metástasis viscerales (pulmón) y cerebrales. Desde la era de las terapias dirigidas contra HER2, los cánceres de mama HER2-positivos muestran un mejor pronóstico, pero pueden evadir la terapia mediante metástasis cerebrales (Buonomo, O. C. *et al.*, 2017).

Los parámetros clínicos (edad, estadío del tumor, expresión de ER, PR y HER2, y grado histológico) también se han integrado en sistemas de puntuación, permitiendo una estimación relativamente precisa de la probabilidad de recurrencia y muerte por cáncer de mama. Ejemplos de estos sistemas incluyen el Índice Pronóstico de Nottingham (NPI), la puntuación PREDICT y Adjuvant! Online (Offersen BV *et al.*, 2016; de Wild SR *et al.*, 2022; Murray Brunt A *et al.*, 2020). Los perfiles de expresión génica, como MammaPrint (Agendia, Ámsterdam, Países Bajos), Oncotype DX Recurrence Score (Genomic Health, Redwood City, CA), Prosigna (PAM 50; NanoString Technologies, Seattle, WA), EndoPredict (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT) y Breast Cancer Index (Biotheranostics, Inc., San Diego, CA), pueden utilizarse para obtener información adicional de pronóstico y/o predicción. Estos complementan la evaluación patológica y ayudan a prever el beneficio de la quimioterapia adyuvante (Hessler LK *et al.*, 2017).

Las principales clases de terapias dirigidas (**Figura 6**) utilizadas en el cáncer de mama ER+ son los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs; por ejemplo, tamoxifeno), los degradadores selectivos del receptor de estrógeno (SERDs; por ejemplo, fulvestrant) o los inhibidores de la aromatasa (Strasser-Weippl K, Goss PE., 2005). El tratamiento estándar (SOC) para los cánceres de mama HER2+ incluye agentes anti-HER, como inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos bloqueadores de HER2 o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs por las siglas en inglés *antibody drug conjugate*) dirigidos a HER2. Dado que el TNBC carece de estas proteínas de superficie celular, los agentes SOC en este contexto están actualmente limitados a quimioterapias citotóxicas. En el caso de los portadores de mutaciones perjudiciales en BRCA1/2, quienes suelen ser pacientes triple negativos, los inhibidores de PARP están actualmente aprobados para su uso en el contexto metastásico y se encuentran en investigación para su uso en el entorno neoadyuvante (Cardoso *et al.*, 2024). Los tratamientos para pacientes TNBC serán explicados en la siguiente sección.



**Figura 6.** Tratamiento sistemático para los distintos subtipos de cáncer de mama (Xin Xiong et al., 2025).

### III. Cáncer de mama triple negativo

## *Caracterización y clasificación*

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa entre el 15 % y el 20 % de los casos de cáncer de mama. En la clínica, se considera TNBC cuando el tumor es negativo para HER2 y presenta una expresión de menos del 1 % de ER y PR mediante inmunotinción. Es un tumor biológicamente más agresivo que los no-TNBC, caracterizado por células cancerosas de grado moderado/alto y altamente proliferativas, lo que, junto con las opciones de tratamiento limitadas, conduce al peor pronóstico entre los subtipos de cáncer de mama (Zagami et al., 2022). En comparación con otros subtipos de cáncer de mama, el tiempo de supervivencia de los pacientes con TNBC es más corto, y la tasa de mortalidad alcanza el 40 % a los 5 años.

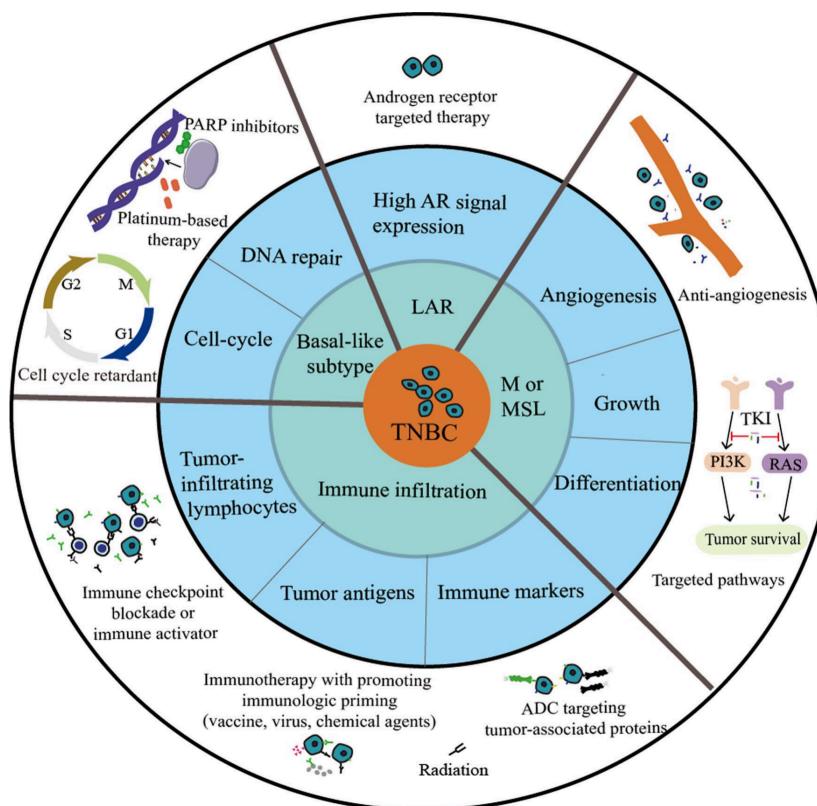
% en los primeros 5 años tras el diagnóstico (Dent R, et al., 2007). El TNBC es altamente invasivo, y aproximadamente el 46 % de los pacientes desarrollará metástasis a distancia. El tiempo medio de supervivencia después de la metástasis es de solo 13,3 meses, y la tasa de recurrencia después de la cirugía es tan alta como el 25%. Las metástasis suelen involucrar el cerebro y los órganos viscerales, ocurriendo principalmente en el tercer año tras el diagnóstico (Lin NU, et al., 2008). En particular, el riesgo de recaída para las pacientes TNBC durante los primeros 3 a 5 años es significativamente mayor en comparación con las mujeres que presentan cáncer de mama con receptores hormonales positivos (C. a Hudis et al., 2011). El tiempo promedio libre de enfermedad detectable en pacientes con cáncer de mama no TNBC es de 35 a 67 meses, mientras que en los pacientes TNBC es de solo 19 a 40 meses. La tasa de mortalidad de los pacientes con TNBC dentro de los 3 meses posteriores a la recurrencia alcanza hasta el 75 % (Zhang L, et al., 2015; Gluz O, et al., 2009). Paradójicamente, la mayor tasa de recurrencia a distancia ocurre a pesar de que estas mujeres muestran inicialmente tasas más altas de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (R. Dent, M. et al., 2007).

Estos tumores responden favorablemente a la quimioterapia neoadyuvante (NACT por sus siglas en inglés: *neoadjuvant chemotherapy*), y tienen más probabilidades de lograr una respuesta patológica completa (pCR por sus siglas en inglés: *pathological complete response*) tras completar la NACT en comparación con los pacientes con tumores de mama que no son TNBC (Hugh J. et al., 2009; Tischkowitz M. et al., 2007). Aunque la pCR predice una excelente supervivencia independientemente del estado de los receptores tumorales, los pacientes TNBC que presentan enfermedad residual después de la NACT experimentan una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia general significativamente más cortas que los pacientes no TNBC (Dent R. et al., 2007; Gabos Z. et al., 2010; Liedtke C. et al., 2008). Las diferencias en la respuesta clínica y la supervivencia tras la quimioterapia neoadyuvante sugieren que un subconjunto de TNBC puede ser intrínsecamente insensible a la quimioterapia citotóxica. Aunque el TNBC se considera una única entidad tumoral clínica, estudios de secuenciación del genoma completo han revelado una amplia heterogeneidad molecular intertumoral e intratumoral. Mediante análisis de expresión génica en 386 tumores, se identificaron originalmente seis subtipos distintos de TNBC (Lehmann BD. et al., 2011). Los subtipos moleculares de TNBC consisten en dos subtipos basales (BL1 y BL2), un inmunomodulador (IM), un mesenquimal (M), un mesenquimal tipo stem (MSL) y un subtipo luminal con receptor de andrógenos (LAR) con biologías y respuestas a la quimioterapia y terapias dirigidas significativamente diferentes (Miyake T, et

al., 2012; Horak CE et al., 2013; Lehmann BD et al., 2011; Saura C et al., 2013; Burstein MD et al., 2014). Los análisis de Gene Ontology mostraron lo siguiente:

- BL1: Caracterizado por una elevada expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la respuesta al daño del ADN. Tienen alta expresión de Ki67. Responden bien a agentes antimitóticos como taxanos (paclitaxel o docetaxel) y al agente de daño al DNA cisplatino, mostrando la tasa más alta de pCR (52%) tras NAC entre todas las subclases (Masuda et al., 2014).
- BL2: Enriquecido en señalización de factores de crecimiento (vías EGF, NGF, MET, Wnt/β-catenina e IGF1R) y marcadores mioepiteliales. Enriquecidos en genes de proliferación, receptores tirosina-quinasas (RTKs), genes de señalización metabólica y expresión de marcadores mioepiteliales (TP63 y MME). Los pacientes rara vez alcanzan pCR (Masuda et al., 2014).
- IM: Compuesto por genes que codifican antígenos inmunes, vías de transducción de señales inmunitarias y de citoquinas, lo que probablemente refleja la expresión génica tanto de las células tumorales como de los linfocitos infiltrantes. Muestran tasas moderadas de pCR similares a los tumores M (Masuda et al., 2014).
- M y MSL: Comparten una elevada expresión de genes implicados en EMT, en la diferenciación celular y en las vías de señalización de factores de crecimiento. Las líneas celulares de este subtipo son sensibles a inhibidores de las familias SRC y PI3K/mTOR. Los tumores MSL están definidos por la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, y una alta expresión de genes relacionados con células madre mesenquimales. Muestran bajos niveles de expresión de genes relacionados con la proliferación, acompañado por un bajo índice mitótico y tienen tasas moderadas de pCR (23–31%) (Masuda et al., 2014). Además, los tumores MSL y sus líneas celulares presentan una expresión aumentada de TGFBRIII, que impulsa la migración e invasión en líneas celulares MSL y crecimiento tumoral *in vivo*.
- LAR: Caracterizado por la expresión génica luminal y dirigido por el receptor de andrógenos (AR). Frecuentemente presentan mutaciones activadoras en PIK3CA, y muestran menor sensibilidad a la quimioterapia, con tasas de pCR del 10% (Masuda et al., 2014). En modelos preclínicos, este subtipo se beneficia de la terapia combinada dirigida a AR (bicalutamida) y PI3K (NCT00468715) (Lehmann, B.D. et al., 2014).

En 2016, Lehmann et al. (Lehmann BD et al., 2016) redefinieron los subtipos moleculares del TNBC, reduciéndose de seis a cuatro (TNBC type-4: BL1, BL2, M y LAR), considerando que los subtipos IM y MSL estaban influenciados principalmente por la contaminación de células estromales normales y células inmunes en el microambiente tumoral. Un análisis transcripcional similar de 198 tumores TNBC no caracterizados previamente identificó cuatro subtipos estables de TNBC: luminal AR (LAR), mesenquimal (MES), basal inmunosuprimido (BLIS) y basal inmuno-activado (BLIA) (Burstein MD et al., 2015). Los análisis de pronóstico mostraron una supervivencia libre de enfermedad (DFS por sus siglas en inglés *disease free survival*) en el orden de BLIA > M > LAR > BLIS. En conjunto, ambos estudios sugieren la existencia de al menos cuatro subclases estables de TNBC: basal (BL1/BL2; BLIS), luminal con receptor de andrógenos (LAR), mesenquimal (M/MSL; MES) e inmunomodulador/activado (IM; BLIA). Esta clasificación molecular resalta la diversidad biológica del TNBC y subraya la necesidad de enfoques terapéuticos personalizados según el subtipo de TNBC (**Figura 7**).



**Figura 7.** Clasificación y opciones terapéuticas en TNBC. En el círculo verde se muestran los cuatro subtipos principales de TNBC, en el círculo azul se muestran los principales componentes o vías de cada subtipo y en el círculo blanco, las terapias más adecuada para cada subtipo de acuerdo a sus características (Yun Li et al., 2022).

### Terapias y tratamiento

El tratamiento de las pacientes con TNBC ha representado un desafío significativo debido a la heterogeneidad de la enfermedad y la ausencia de blancos moleculares bien definidos (P.

Zagami and L.A. Carey, 2022). Clínicamente, esto hace que sea especialmente desafiante encontrar la quimioterapia óptima que permita una supervivencia más prolongada sin metástasis y una mayor supervivencia general para estas mujeres (Bianchini et al., 2022). La quimioterapia ha sido durante mucho tiempo la base del tratamiento para el TNBC metastásico. Sin embargo, este enfoque ha cambiado recientemente con la integración de los inhibidores de PARP (PARPis: del inglés *poly adenosine diphosphate-(ADP)-ribose polymerase inhibitors*) para pacientes con mutaciones en BRCA y también con los resultados positivos de la combinación de quimioterapia e inmunoterapia en pacientes con tumores positivos para la proteína PD-L1 (del inglés *programmed cell death 1 ligand*) (expresión de PD-L1 en células inmunitarias infiltrantes del tumor  $\geq 1\%$ ) (Sarhangi et al., 2023).

#### Inhibidores de PARP:

El subtipo TNBC presenta la mayor incidencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 comparado con los otros subtipos. Se estima que aproximadamente el 20% de los pacientes con TNBC tienen una mutación germinal en estos genes. En mujeres con TNBC que presentan una mutación en BRCA, tanto la quimioterapia basada en platinos (carboplatino/cisplatino) como los PARPis se recomiendan como tratamiento de primera línea (Sarhangi et al., 2023).

Las proteínas codificadas por los genes BRCA contribuyen a la reparación de rupturas de doble hebra en el ADN como parte de la vía de recombinación homóloga (Yoshida K, Miki Y; 2004), con lo cual las células con estas mutaciones tienen un mecanismo defectuoso de reparación del ADN. Los agentes alquilantes, como los platinos, destruyen las células cancerosas al interferir con el ADN y causar numerosas rupturas de hebra sencilla, induciendo así apoptosis y evitando la división celular. La formación de aductos de ADN-Pt, que contribuyen al arresto del ciclo celular y la apoptosis, es el principal mecanismo antitumoral del platino una vez dentro de la célula.

La inhibición de PARP genera rupturas de doble hebra en células en replicación (Farmer, H. et al., 2005). En células con BRCA1/2 wild type, estas rupturas se reparan mediante recombinación homóloga. Sin embargo, en células deficientes en BRCA1/2, como la recombinación homóloga está afectada, las rupturas en las hebras de ADN dependen de la funcionalidad de PARP1 para su reparación (Farmer, H. et al., 2005; Bryant, H. E. et al., 2005). Por lo tanto, la inhibición de PARP1 mediante interferencia de ARN o inhibidores químicos conduce a una toxicidad severa y altamente selectiva en células defectuosas en BRCA1/2, un fenómeno conocido como "letalidad sintética" donde las células no pueden

reparar su ADN y se ven obligadas a someterse a apoptosis (Turner, N. C. et al., 2008). Estudios recientes han mostrado que el uso de olaparib (inhibidor de PARP) en etapas tempranas de la enfermedad mejora significativamente la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes con enfermedad de alto riesgo (Tutt et al., 2021).

### Inmunoterapia:

**PD-1** es una proteína transmembrana expresada en células T, células B y células NK. El ligando de PD-1 (**PD-L1**), que se expresa en células normales y células cancerosas, se une a PD-1 e inhibe directamente la apoptosis de la célula tumoral mientras promueve el agotamiento periférico de las células T efectoras y la conversión de células T efectoras en células T regulatorias (Treg) (Francisco, L.M. et al., 2009). Los tumores pueden regular el aumento en la expresión de PD-1 y PD-L1 (Tumeh, P.C. et al., 2014). PD-L1 se utiliza clínicamente como biomarcador para la respuesta a la inhibición de puntos de control inmunitario (ICIs) en malignidades avanzadas (Salmanejad A et al., 2019).

La elevada inestabilidad genómica y carga mutacional en el TNBC generan una mayor propensión a formar neoantígenos, que pueden ser reconocidos como "no propios" por el sistema inmunitario adaptativo (Brown, S. D., 2014). En consecuencia, los tumores TNBC presentan una mayor cantidad de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*) (Loi, S. et al., 2013) y una mayor expresión de la proteína PD-L1 en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. La expresión de PD-L1 se asocia significativamente con la presencia de TILs (Wimberly, H. et al., 2015; Ali, H. R. et al., 2015). Una alta infiltración de TILs se ha relacionado con un menor riesgo de recaída en pacientes con cáncer de mama (Aaltomaa, S. et al., 1992). En el TNBC, la asociación entre la presencia de TILs o la expresión de marcadores inmunitarios y la probabilidad de lograr una pCR después de la quimioterapia neoadyuvante es consistente y significativa. Un alto nivel de expresión de marcadores inmunitarios, asociado con diferentes tipos de células inmunitarias, ha demostrado beneficios con la quimioterapia en el TNBC (Gu-Trantien, C. et al., 2013; West, N. R. et al., 2011; Denkert, C. et al., 2015).

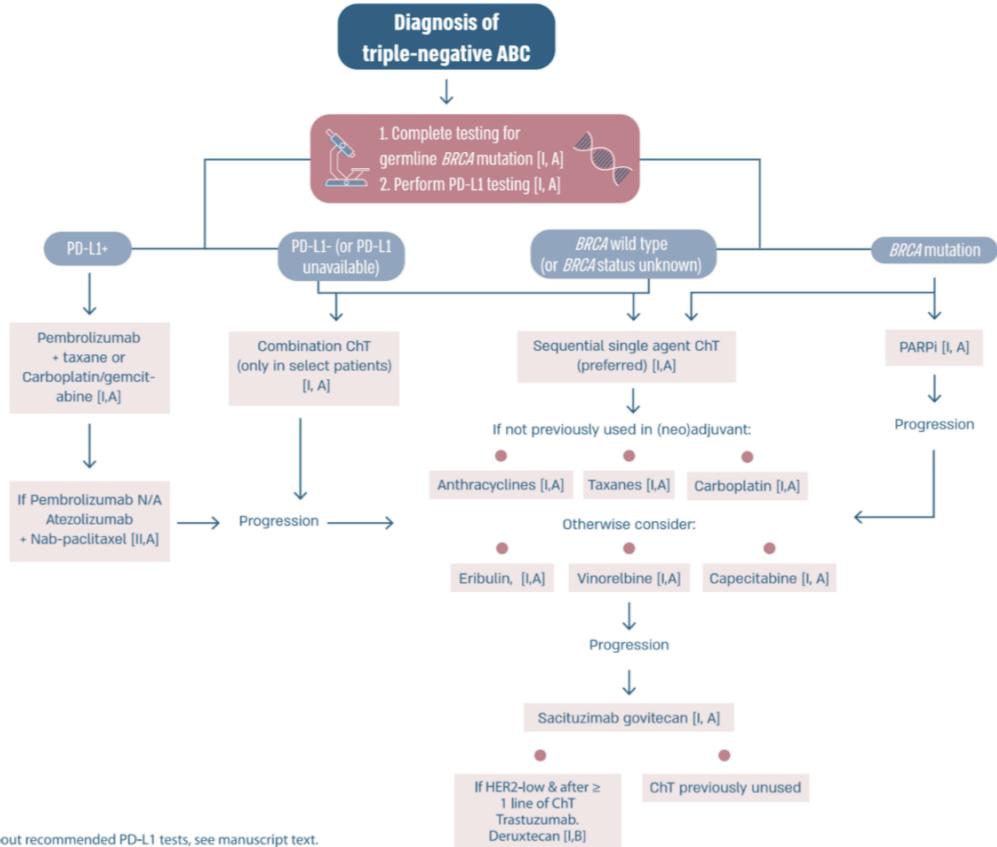
A diferencia de los cánceres de melanoma y pulmón, la monoterapia con los inhibidores de puntos de control inmunitarios dirigidos contra PD-1 o PDL-1 (**ICIs** por sus siglas en inglés *immune checkpoint inhibitors*) ha mostrado un beneficio limitado en el cáncer de mama. Sin embargo, la combinación de ICIs con quimioterapias de base ha demostrado beneficios notables, especialmente en el entorno de enfermedad metastásica de primera línea, donde la función inmunológica es menos probable que esté "agotada" (Cortés et al., 2020; Schmid et al., 2018). En pacientes tratados por primera vez, esta combinación ha

logrado mejorar las tasas de pCR y la supervivencia libre de progresión (PFS por sus siglas en inglés *progression free survival*) (Mittendorf et al., 2020; Schmid et al., 2022). La FDA aprobó atezolizumab para el tratamiento de TNBC localmente avanzado irresecable o metastásico (mTNBC) con expresión positiva de PD-L1 el 8 de marzo de 2019, convirtiéndose en el primer anticuerpo monoclonal de bloqueo inmunitario aprobado para TNBC. Posteriormente, el 13 de noviembre de 2020, la FDA también aprobó pembrolizumab en combinación con quimioterapia para pacientes con TNBC recurrente localmente irresecable o mTNBC con expresión positiva de PD-L1 (US Food and Drug Administration website <http://www.accessdata.fda.gov/>).

Otro avance destacado ha sido el desarrollo de anticuerpos conjugados con drogas (terapia **ADC** por sus siglas en inglés *Antibody-Drug Conjugates*), son una clase novedosa de terapias oncológicas complejas que consisten en un anticuerpo, un enlace y un agente citotóxico. La base del anticuerpo generalmente se dirige a una proteína de superficie celular expresada por células tumorales y/o en el microambiente tumoral, como sacituzumab govitecan (SG), aprobado por la FDA en 2020 para pacientes con cáncer de mama triple negativo metastásico (mTNBC) refractario y recurrente, tratados al menos dos veces previamente (US Food and Drug Administration website <http://www.accessdata.fda.gov/>). SG es un anticuerpo humano monoclonal dirigido contra el antígeno 2 de superficie celular del trofoblasto (TROP2), glicoproteína sobreexpresada en el 80% de los cánceres de mama, especialmente en el TNBC. El agente citotóxico, SN-38 (un potente inhibidor de la topoisomerasa I), está unido al anticuerpo monoclonal humanizado anti-Trop-2 hRS7 IgG1κ mediante un enlace CL2A escindible, lo que permite la entrega de concentraciones terapéuticas del fármaco tanto en las células target como en las células vecinas (Zong et al., 2021).

En Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) ha autorizado la realización de ensayos clínicos con sacituzumab govitecán en pacientes con cáncer de mama metastásico con receptor hormonal positivo y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano negativo (HR+/HER2-). Atezolizumab y Olaparib están disponibles en nuestro país.

En resumen, el tratamiento para pacientes TNBC se muestra en la **Figura 8**:



**Figura 8.** Tratamiento de TNBC (Cardoso et al, 2024).

ABC, advanced breast cancer; ChT, chemotherapy; PARPi, poly-adenosine diphosphate ribose polymerase inhibitor; PD-L1, programmed death-ligand 1; N/A, not available.

De los resultados de los ensayos clínicos actuales de TNBC, se sabe que el beneficio de una única terapia convencional (monoquimioterapia) o inmunoterapia no es suficiente debido a la heterogeneidad tumoral, la evolución del tumor y la resistencia a drogas (M. A. Mir et al., 2020; Chalakur-Ramireddy et al., 2018; Lee and Mustafa, 2018). Por lo tanto, la **terapia combinada** es actualmente la opción preferida por la práctica clínica para el tratamiento del TNBC. A partir de estos estudios, los pacientes con TNBC no avanzado mostraron buenas respuestas tras la terapia combinada; sin embargo, el pronóstico del TNBC avanzado sigue siendo pobre. Sin lugar a dudas, el tratamiento personalizado y preciso del TNBC depende del estudio de las características de expresión molecular y los mecanismos biológicos del tumor. Por lo tanto, la evaluación frecuente de la expresión inmunomolecular y el análisis de mutaciones en tejidos tumorales de TNBC resulta muy importante, proporcionando evidencia sólida para determinar los regímenes de terapia combinada del TNBC (Yun Li et al., 2022).

## ***TNBC- Heterogeneidad tumoral***

La heterogeneidad observada en el cáncer de mama es una de las principales causas del fracaso terapéutico. Las variaciones en las características genéticas y epigenéticas dentro de un subconjunto de células cancerosas (heterogeneidad intratumoral) pueden alterar tanto el pronóstico como la respuesta a los medicamentos. Cada cáncer es genéticamente heterogéneo, lo que implica que no hay garantía de que un único tratamiento sea eficaz contra todos los clones malignos que componen la masa tumoral.

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) no es una enfermedad única, sino un conjunto de múltiples entidades con heterogeneidad histopatológica, transcriptómica y genómica pronunciada:

- Heterogeneidad histopatológica: El TNBC incluye varias variantes histológicas, como baja diferenciación tumoral, presencia de elementos metaplásicos, características medulares y respuesta linfocítica estromal (Livasy, C. A. et al. , 2006; Kreike, B. et al., 2007). Además, esta vasta heterogeneidad en TNBC también se extiende al microambiente inmunitario tumoral, que exhibe una amplia gama de niveles de infiltrado de linfocitos y monocitos, así como la activación de puntos de control inhibitorios como PD-1/PD-L1 (Spranger, S. et al., 2013).
- Heterogeneidad transcriptómica: TNBC también presenta una gran heterogeneidad en el nivel transcriptómico, el estudio pionero de Lehmann et al. (Lehmann, B. D. et al., 2011) identificó siete subtipos de TNBC: Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Inmunomodulador (IM), Mesenquimal (M), Tipo mesenquimal similar a células madre (MSL), Receptor androgénico luminal (LAR), Inestable (UNS); que luego pasaron a ser cuatro (Lehmann BD et al., 2016): BL, M, I y LAR (sección “Clasificación de TNBC”).
- Heterogeneidad genómica: El TNBC se caracteriza por genomas complejos, con alta inestabilidad genética y patrones intrincados de alteraciones en el número de copias y reordenamientos cromosómicos (Cancer Genome Atlas, N., 2012; Kandoth, C. et al., 2013; Nik-Zainal, S. et al., 2016; Bertucci, F. et al. , 2019; Shah, S. P. et al., 2012). Utilizando técnicas de secuenciación de células individuales, Wang y sus colegas (Wang Y et al., 2014) investigaron el grado de diversidad genética clonal en cánceres positivos para ER y en cánceres triple negativos. Descubrieron que las células de cáncer de mama triple negativo presentan una tasa de mutación intrínseca muy alta, lo que genera una amplia diversidad genómica. Los tumores triple negativos presentan, en promedio, 1.68 mutaciones somáticas

por Mb de regiones codificantes (~60 mutaciones somáticas por tumor) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Kandoth, C. et al., 2013) y una ocurrencia frecuente de múltiples aberraciones en el número de copias que afectan genes implicados en diversas vías de señalización (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Shah, S. P. et al., 2012; Curtis, C. et al., 2012). Entre las mutaciones más frecuentes en TNBC, se destacan:

- TP53, con una frecuencia del 60–70%, es significativamente más común en tumores basales (62–80%) que en no basales (43%) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012; Shah, S. P. et al., 2012).
- PIK3CA es el siguiente gen más mutado en TNBC, en ~10% de los casos globalmente (Shah, S. P. et al., 2012; Lehmann, B. D. et al., 2014), es mucho más frecuente en el subtipo LAR (46.2%) que en otros subtipos (promedio 4.5%) (Lehmann, B. D. et al., 2014).
- Todas las demás mutaciones tienen una frecuencia baja (1–5%) o muy baja (<1%) en los TNBC. Algunas de estas son accionables, como ERBB2, o son el blanco de terapias existentes, como BRAFV600E (Shah, S. P. et al., 2012).

Por otro lado, cabe destacar que la clasificación intrínseca de células malignas individuales indicó la presencia de fenotipos diversos dentro de tumores individuales, con múltiples subtipos intrínsecos evidentes en muchos tumores (Chung et al., 2017; Wu et al., 2021). Por ejemplo, se detectó un pequeño subconjunto de células de tipo basal en algunos tumores luminales y HER2-enriquecidos.

En TNBC, el perfil genómico de las biopsias líquidas basado en ctDNA ha demostrado ser útil para caracterizar alteraciones específicas del tumor y predecir el pronóstico del paciente (Takeshita, T. et al., 2015; Madic, J. et al., 2015; Stover, D. G. et al., 2018; Radovich, M. et al., 2020). Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con biopsias líquidas para, por ejemplo, evaluar la correlación entre la detección de Enfermedad Residual Molecular (MRD) mediante un test basado en ADN tumoral circulante y la pCR después de la quimioterapia neoadyuvante (NAC) en pacientes con TNBC en estadio I-III. Los resultados de este estudio buscan mejorar la detección de MRD y los resultados clínicos en futuros pacientes (NCT06230185).

La diversidad molecular e histológica del TNBC resalta la necesidad de enfoques terapéuticos personalizados y el uso de tecnologías avanzadas (como las biopsias líquidas)

para mejorar el diagnóstico y la vigilancia de la enfermedad. Esto subraya el potencial de las terapias dirigidas basadas en características moleculares específicas del tumor.

### ***TNBC- Quimioresistencia***

Los TNBC suelen volverse resistentes durante los tratamientos o pueden ser intrínsecamente no respondedores a la quimioterapia, con numerosos mecanismos posibles de quimiorresistencia (Ferrari et al., 2022).

Uno de los principales mecanismos está mediado por **transportadores ABC** (ABC ATP-binding cassette), que provocan la salida dependiente de ATP de varios compuestos de quimioterapia a través de las membranas celulares. Interesantemente, se observó una expresión significativamente mayor de la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (ABCC1/MRP1 por sus siglas en inglés *multidrug-resistant protein-1*), la proteína de resistencia al cáncer de mama (ABCG2/BCRP por sus siglas en inglés *breast cancer resistance protein*) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos 8 (ABCC11/MRP8 por sus siglas en inglés *multidrug-resistant protein-8*) en TNBC (Yamada, A. et al., 2013; Anna Makuch-Kocka et al., 2023). En las últimas tres décadas, se han desarrollado agentes que han mostrado un gran potencial como inhibidores en modelos *in vitro* y en algunos modelos *in vivo* (Darby RA et al., 2011; Dong J. et al., 2020; Krishna R. et al., 2001; Palmeira A et al., 2012; Jaramillo AC et al., 2018). Sin embargo, hasta la fecha, ningún inhibidor ha demostrado revertir significativamente la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en ensayos clínicos en humanos y hay toxicidades inaceptables asociadas (Borst P. et al., 2020; Robey RW et al., 2018).

La quimiorresistencia observada en TNBC también puede deberse a la **presencia de CSCs** tras el tratamiento, lo que lleva subsecuentemente al recrecimiento tumoral (Clara, J. A. et al., 2020). La quimiorresistencia asociada a las CSCs puede deberse a varios factores, incluyendo su tasa de proliferación relativamente baja y la alta expresión de transportadores ABC (Zhou, S. et al., 2001). Se están evaluando diferentes estrategias terapéuticas para superar la quimiorresistencia de las CSCs, incluyendo dirigirse hacia los antígenos de superficie y vías de señalización cruciales para su autorrenovación (Clara, J. A. et al., 2020).

Otras causas de la quimiorresistencia en TNBC son: la hipoxia (Vaupel, P., 2008), las mutaciones en TP53 (Friboulet, L. et al, 2019), las vías NF-κB (Messeha, S. S. et al., 2018),

PAM (Ueng, S. H. et al., 2012; Steelman, L. S. et al., 2008), JAK/STAT (Marra et al., 2020), EGFR y IGF-1R (Kim, A. et al., 2017; Farabaugh, S. M. et al., 2015).

La experiencia de esfuerzos pasados y actuales sugiere que los agentes individuales (monoterapia) tienen pocas probabilidades de ser efectivos contra el TNBC. Utilizarlos en combinación con otras terapias podría ser una estrategia prometedora para neutralizar la resistencia intrínseca o adquirida a los medicamentos (Yun Li et al., 2022).

### **TNBC-CSCs**

Las CSCs de mama (o BCSCs en donde B es *breast*) representan una subpoblación muy pequeña frente a la población total de células tumorales (0.0001% a 10%: Dos Santos y Da Silva, 2013, pudiendo llegar a 30%, Enderling, 2015). Es una subpoblación dinámica de células tumorales que conservan las propiedades de las células madre mamarias y, lo más notable, la capacidad de repoblar un tumor heterogéneo a partir de una sola célula (Charafe-Jauffret, E. et al., 2009). Las BCSCs tienen tasas de proliferación más lentas y mayores grados de resistencia a la quimioterapia en comparación con las células cancerosas no madre (Creighton, C. J. et al., 2009), y a menudo muestran cambios en el fenotipo similares a los asociados con células que experimentan EMT (Mani, S. A. et al., 2008; Creighton, C. J. et al., 2010).

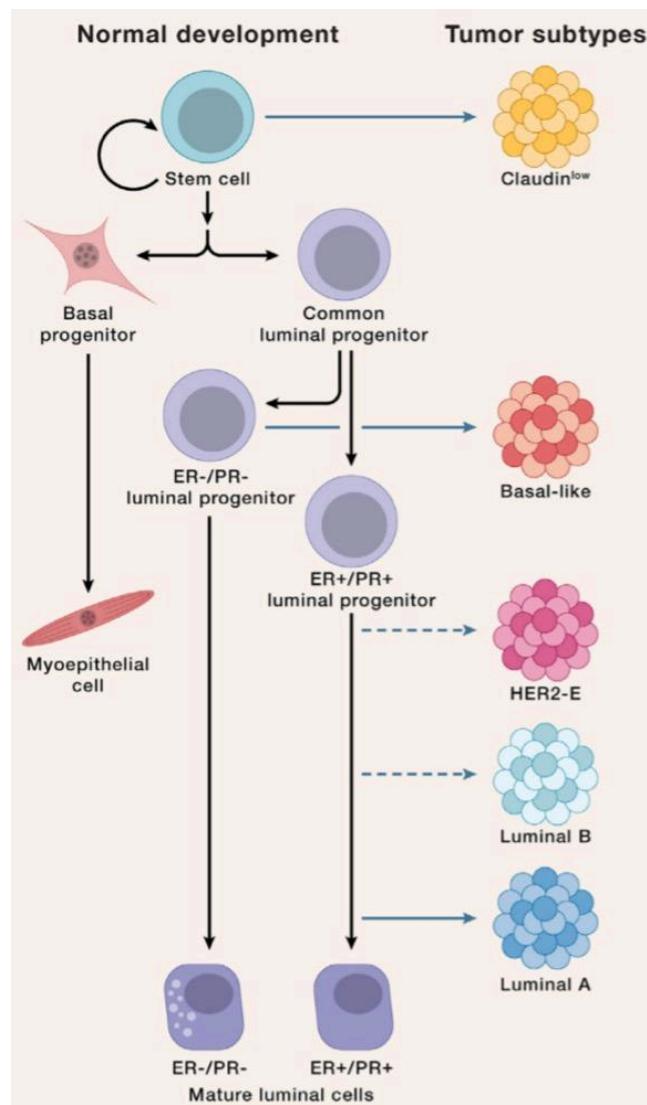
Las BCSCs y las células madre normales (SCs) comparten habilidades de resistencia similares (Carnero, A. et al., 2016). Debido a que el *pool* celular de un organismo es mantenido por las SCs, es necesario proteger biológicamente estas SCs. Por ello, se han desarrollado varios mecanismos para mantener la capacidad *stem* celular y evitar la muerte por apoptosis. Las CSCs parecen emplear estos mecanismos intrínsecos contra las terapias anticancerígenas. Como resultado, el tratamiento con quimioterapia y radioterapia erradica a la mayoría de la población de no-BCSCs, pero no a las BCSCs, lo que lleva a la recurrencia de la enfermedad (Dallas, N.A. et al., 2009).

El uso del patrón de expresión CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> junto con la actividad de ALDH (aldehído deshidrogenasa), además de enfoques funcionales como la formación de mamósferas o la siembra de tumores en xenoinjertos, se ha convertido en el "estándar de oro" para la caracterización de BCSCs *in vitro* (Liedtke et al., 2013). También la capacidad de excluir sustratos de transportadores ABC (Pontier, S. M. & Muller, W. J., 2009; Britton, K. M. et al., 2012). Utilizando análisis inmunohistoquímico seguido de perfil molecular,

Honeth et al. (Honeth G et al., 2008) demostraron una correlación entre la expresión de CD44+/CD24-/low y el subtipo TNBC. Resultados similares se observaron en un análisis de 466 carcinomas invasivos de mama y ocho líneas celulares de cáncer de mama que representaban distintos subtipos moleculares, donde el cáncer de mama basal presentó el porcentaje más alto de células tumorales con el fenotipo de BCSCs CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> y positividad para ALDH1 (Ricardo S et al., 2011; Charafe-Jauffret E et al., 2009). Estas células positivas para ALDH también mostraron características de CSCs, ya que podían formar mamósferas *in vitro* y tumores *in vivo* (Charafe-Jauffret E et al., 2009). En otros estudios también se encontró que el TNBC resulta estar intrínsecamente enriquecido en CSCs, aunque se han observado CSCs en todos los subtipos de cáncer de mama (Park, S. Y. et al., 2010; Ma, F. et al., 2014). Esto también podría explicar el pronóstico desfavorable del TNBC en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. Además, se ha descrito la acumulación de CSCs quimiorresistentes en tumores residuales después de la quimioterapia neoadyuvante (Lee, H. E. et al., 2011). Clínicamente, la expresión de CSCs se asocia con una peor respuesta a la quimioterapia, metástasis en los ganglios linfáticos, metástasis distantes, recurrencia, y peor supervivencia libre de enfermedad (DFS) y supervivencia global (OS) (Chen, Y. et al., 2015; Lin, Y. et al., 2012).

Por otro lado, el perfil molecular ha proporcionado una base importante para comprender la etiología del cáncer de mama, ya que los subtipos intrínsecos muestran una notable similitud con las células normales dentro de la jerarquía de células madre mamarias (Lim et al., 2009) (**Figura 9**). Las similitudes moleculares entre células tumorales de un subtipo y células madre mamarias sugieren que éstas últimas sirven como células de origen para la transformación maligna en los diferentes subtipos, con una heterogeneidad adicional atribuible a influencias intrínsecas y extrínsecas, incluyendo mutaciones, eventos epigenéticos y el microambiente (Lim et al., 2009). Los tumores *claudin-low*, que están pobremente diferenciados, presentan transcriptomas notablemente similares a los de la población enriquecida en células madre del tejido mamario normal. Lo mismo sucede entre el progenitor luminal y el fenotipo *basal-like*. Existe evidencia convincente de que las células progenitoras luminales son los precursores de los cánceres basales (Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010). En el extremo opuesto del espectro de diferenciación, los tumores luminales A se alinean más estrechamente con las células luminales maduras (Nolan et al., 2023). Los subtipos *claudin-low* y basal coincidentes con las células madre más indiferenciadas del tejido mamario, son los que presentan peor pronóstico.

Como se puede observar en la **Figura 9**, las flechas indican el tipo de célula epitelial normal más cercano ( posible célula de origen) para cada subtipo tumoral.



**Figura 9.** Modelo esquemático que muestra las relaciones entre la jerarquía de diferenciación normal de la mama y los subtipos intrínsecos basado en la comparación de firmas de expresión génica (Lim et al., 2009) y estudios en células madre de ratón (Fu et al., 2020) (Nolan et al., 2023).

En la búsqueda de procesos moleculares que contribuyen a comprender la biología de los **tumores de mama triple negativos (TNBC)** y encontrar nuevos blancos terapéuticos, nuestro grupo y otros, identificaron al factor de transcripción **RUNX1** como marcador de mal pronóstico en esta patología (Ferrari 2014, Recouvreux 1016; Fernández 2023, Chen 2024).

## IV. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX

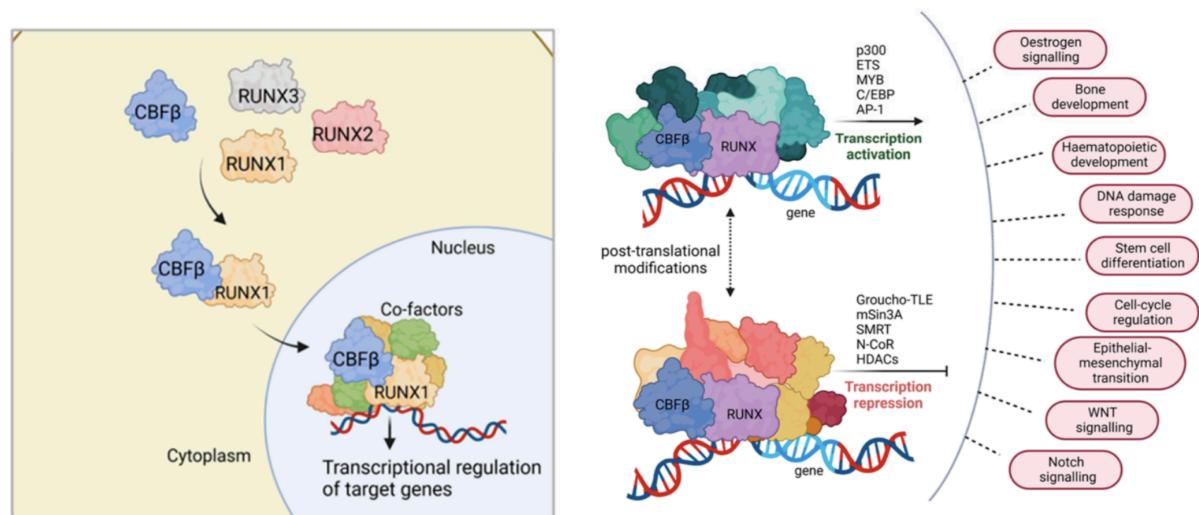
### *Estructura y caracterización de la familia RUNX*

La familia de factores de transcripción *Runt-related* (RUNX) actúan como reguladores maestros del desarrollo embrionario y están involucrados en procesos celulares esenciales, como la proliferación, diferenciación, especificación de linaje celular e incluso apoptosis (Chuang LS et al., 2013; Hongyang Yi et al., 2022; Xinyi Chen et al., 2024; Michael Lie-a-ling et al., 2019; Hong D. et al., 2018; Alessandra I. Riggio and Karen Blyth, 2017; Tsung-Chieh Lin, 2022; Khan, A.S. et al., 2023, Adhiraj Roy et al., 2023). Tradicionalmente descrito como una proteína de unión al ADN que se asocia con CBF $\beta$  para formar el complejo de transcripción heterodimérico CBF (por sus siglas en inglés *core-binding factor*), RUNX es ahora considerado una proteína multifacética que interacciona con diversas proteínas para dirigir resultados biológicos de manera dependiente del contexto (Ito Y., 2008; Mevel et al., 2019).

Los tres miembros de la familia RUNX (1, 2 y 3) presentan una expresión específica de tejido y funciones restringidas al linaje embrionario. Los mamíferos tienen tres genes *RUNX* con patrones de expresión altamente dinámicos, dependiendo de las etapas de diferenciación y desarrollo (Blyth K. et al., 2005). Funcionalmente, **RUNX1** es crucial para la diferenciación de células hematopoyéticas (diferenciación de células madre hematopoyéticas en células sanguíneas maduras) (Dowdy CR. et al., 2010; Yamagata T. et al., 2005). **RUNX2** es esencial para la osteogénesis (Lian JB and Stein G., 2003; Komori T., 2003). **RUNX3** regula la neurogénesis (Inoue K. et al., 2002), el desarrollo de linfocitos T (Woolf E. et al., 2007) y el crecimiento del epitelio gástrico (Fukamachi H., 2006). Los modelos de ratón han demostrado que la interrupción de genes *Runx* individuales (KO condicionales) da lugar a fenotipos distintos, lo que indica funciones no redundantes y específicas de tejido: la eliminación de *Runx1* se asocia con la ausencia de hematopoyesis definitiva; la eliminación de *Runx2* resulta en la falta de formación ósea, y la eliminación de *Runx3* conduce a ratones con defectos en el desarrollo de células T citotóxicas, así como trastornos gastrointestinales y neuronales (Ito K. et al., 2008; Li QL et al., 2002; Inoue K. et al., 2002). Los tres genes *Runx* de mamíferos son parte de una triplicación ancestral de 500 kb, la cual es evidente en los cromosomas 1p (*Runx3*), 6p (*Runx2*) y 21q (*Runx1*) (Levanon D. et al., 1994).

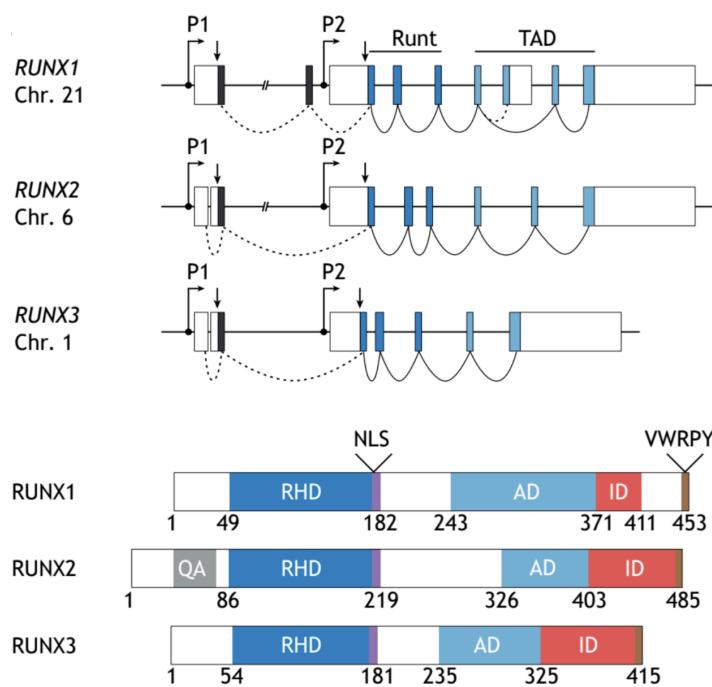
La proteína RUNX de mamíferos contiene varias regiones conservadas. La característica más altamente conservada de las proteínas RUNX es el dominio Runt de 128 aminoácidos (Rennert et al., 2003), ubicado cerca del extremo N terminal. El **dominio RHD** (del inglés

*Runt Homology Domain*) es esencial para (1) la unión al ADN en el motivo consenso RUNX ‘PyGPyGGTPy’, siendo Py cualquier pirimidina (Wang y Speck, 1992), (2) las interacciones proteína-proteína (Lilly et al., 2016; Nagata et al., 1999) y (3) la localización nuclear de los factores RUNX (Telfer et al., 2004). El dominio Runt también es necesario para la interacción con la subunidad *core-binding factor subunit beta* (**CBF $\beta$** ) (Kamachi Y. et al., 1990). CBF $\beta$  es una proteína expresada de manera ubicua, codificada en mamíferos por el gen *Cbf $\beta$*  de 50 kb (Kent, W.J. et al., 2002). CBF $\beta$  es una proteína que no se une al ADN y carece de una señal de localización nuclear (Tahirov, T.H. et al., 2001), residiendo en el citoplasma, donde puede unirse al RHD en las proteínas RUNX (Bushweller, J.H. et al., 1999). Mientras que la unión a las proteínas RUNX permite que CBF $\beta$  se transporte al núcleo (**Figura 10a**), éste estabiliza alóstéricamente el punto de contacto entre el RHD y el ADN (Bravo, J. et al., 2001), mejorando así la afinidad de unión al ADN de las proteínas RUNX en un factor de 40 veces (Yan, J. et al., 2004). Además, la unión a CBF $\beta$  puede proteger a las proteínas RUNX, como se muestra en el caso de RUNX1, donde la heterodimerización con CBF $\beta$  previene su degradación (Huang, G. et al., 2001). De hecho, los niveles de RUNX1 son apenas detectables en ratones knockout de Cbf $\beta$ , y se ha demostrado que CBF $\beta$  aumenta la vida media de esta proteína previniendo la proteólisis de RUNX1 mediante ubiquitinación (Huang, G. et al., 2001). Esta regulación integral de, y por RUNX/CBF $\beta$  es imperativa para controlar las vías celulares tanto en el desarrollo como en la enfermedad (**Figura 10b**). De hecho, la pérdida de cualquiera de los componentes del complejo CBF tiene efectos letales en el desarrollo normal. Las delecciones homocigotas de Runx1 o Cbf $\beta$  *in vivo* previenen el desarrollo hematopoyético, siendo el genotipo Runx1-/- letal durante el desarrollo embrionario (Okuda T et al., 1996; Otto F et al., 1997; Li QL et al., 2002).



**Figura 10.** **a-** CBF $\beta$  interactúa con miembros de la familia RUNX dentro del citoplasma. Una vez unido a cualquiera de las tres proteínas RUNX, en este caso RUNX1, el complejo es translocado al núcleo, donde puede unirse al ADN y regular la transcripción. El reclutamiento de diversos cofactores determina el destino de la regulación transcripcional de los genes target de RUNX/CBF $\beta$ . **b-** El complejo CBF trabaja en conjunto con una variedad de coactivadores y corepresores transcripcionales para regular vías celulares cruciales. (Figura obtenida de Khan et al., 2023)

La región C-terminal es menos conservada y contiene un dominio de transactivación (TAD por las siglas en inglés *transactivation domain*), responsable de la transactivación de genes target, y un dominio inhibitorio (ID), que regula negativamente la expresión de proteínas (Javed A. et al., 2000) (Figura 11). Dentro del TAD, las proteínas RUNX también poseen una secuencia conservada de señal de orientación a la matriz nuclear (NMTS), que desempeña un papel en la regulación de la actividad de RUNX y su localización nuclear. También existe una secuencia de nueve aminoácidos ubicada después del RHD, denominada señal de localización nuclear (NLS). Los múltiples sitios de interacción proteica en RUNX (motivo PY y motivo VWRPY) sugieren que pueden generarse diferentes resultados mediante la unión combinatoria de proteínas (Terry A. et al., 2004; Seo et al., 2012b).



homología Runt (RHD), la señal de localización nuclear (NLS), los dominios de transactivación (AD) e inhibición (ID), el sitio de unión C-terminal para Groucho/TLE (VWRPY) y la secuencia rica en glutamina/alanina (QA) específica de RUNX2. (Renaud Mevel et al., 2019).

**Figura 11.** **a-** Estructura genómica conservada de los genes humanos *Runx1* (Entrez Gene ID: 861), *RUNX2* (Entrez Gene ID: 860) y *RUNX3* (Entrez Gene ID: 864). Los codones ATG iniciadores de los transcritos derivados de P1 y P2 están indicados con flechas. Los exones que codifican para los dominios Runt y de transactivación (TAD) se muestran en azul oscuro y azul claro, respectivamente, mientras que las regiones no traducidas (UTRs) están en blanco. El empalme dominante se indica con una línea continua, y algunas variantes de empalme alternativo se muestran con una línea discontinua. **b-** Esquema de las estructuras y dominios proteicos humanos RUNX1 (NP\_001001890), RUNX2 (NP\_001265407) y RUNX3 (NP\_004341), que incluyen el dominio conservado de

## ***RUNX como regulador clave del destino de las células madre***

Los factores RUNX desempeñan roles clave en la regulación del destino de las células madre durante la homeostasis y la regeneración de diversos tejidos. Las células cancerosas parecen haber corrompido estas funciones asociadas a las células madre para promover la oncogénesis (Deltcheva and Nimmo, 2017).

RUNX1 está principalmente involucrado en el desarrollo hematopoyético, y RUNX2 en el desarrollo esquelético (Mevel et al., 2019). Ambos participan en el desarrollo de la glándula mamaria (Mevel et al., 2019; Khan, A.S. et al., 2023):

### Células madre hematopoyéticas:

Ha sido reportado que RUNX1 es necesario para el desarrollo de las células madre hematopoyéticas (HSCs por sus siglas en inglés *Hematopoietic Stem Cells*) a partir de células endoteliales (Okuda T. et al., 1996) a través de la transición endotelial-hematopoyética (EHT por sus siglas en inglés *Endothelial Hematopoietic Transition*). Aunque no es indispensable para el mantenimiento de las HSCs en ratones adultos, es esencial para la maduración y diferenciación de los diferentes componentes sanguíneos (Chen MJ et al., 2009). La modulación precisa de los niveles y la actividad de RUNX1 es esencial para la eficiencia y el momento adecuado de la aparición de los progenitores hematopoyéticos (Cai et al., 2000; Eliades et al., 2016; Lie-A-Ling et al., 2018). Esto se debe, en parte, a la activación secuencial de los dos promotores de Runx1: los transcritos del promotor proximal P2 se detectan durante EHT, mientras que los transcritos del promotor distal P1 aparecen únicamente cuando el compromiso hematopoyético está completo (Challen y Goodell, 2010; Fujita et al., 2001; Sroczynska et al., 2009).

RUNX1 desempeña un papel crucial en el desarrollo del sistema hematopoyético, y sus mutaciones conducen a la aparición de neoplasias hematológicas, como la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y el trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda (FPD/AML) (Ito, Y. et al., 2015; Sood, R. et al., 2017; Lie, A.L.M. et al., 2020). Dado que la mayoría de las mutaciones de RUNX1 detectadas en estos pacientes se definen como mutaciones de pérdida de función, se considera que RUNX1 actúa principalmente como un supresor tumoral en estos tipos de cánceres.

### Células madre mesenquimales:

Las células madre mesenquimales normales (MSCs del inglés *mesenchymal stem cells*) son células estromales multipotentes capaces de autorrenovarse y diferenciarse en cartílago, hueso y tejido adiposo.

Ha sido reportado que RUNX2 es un regulador maestro del desarrollo esquelético, desempeñando múltiples funciones en la especificación y diferenciación tanto de osteoblastos como de condrocitos (Komori, 2018). La formación del esqueleto óseo ocurre a través de dos procesos distintos. La formación ósea de novo en tejido blando se logra mediante la diferenciación de MSCs en osteoblastos, que maduran a osteocitos y eventualmente forman hueso, en un proceso llamado osificación intramembranosa (Marks y Odgren, 2002). Alternativamente, las MSCs pueden diferenciarse en condrocitos, formando cartílago, que puede ser permanente o bien permitir la llegada de osteoclastos y células mesenquimales, iniciando la osificación endocondral. En este proceso, los condrocitos residentes sufren diferenciación terminal y apoptosis, mientras que las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos y forman hueso sobre las estructuras cartilaginosas (Komori, 2018). El papel de Runx2 en la formación ósea se descubrió mediante modelos de ratón *knockout*. Los ratones nulos para Runx2 mueren poco después del nacimiento debido a insuficiencia respiratoria, y el análisis de sus esqueletos reveló que están compuestos completamente de cartílago, sin hueso. En estos ratones, los osteoblastos están completamente ausentes y la expresión de proteínas de la matriz ósea es prácticamente nula (Inada et al., 1999; Komori et al., 1997). Además, Runx2 se expresa en condrocitos maduros (Enomoto et al., 2000), y su eliminación *in vitro* conduce a la pérdida del fenotipo diferenciado (Enomoto et al., 2004). En conclusión, RUNX2 es un factor clave en la maduración de los condrocitos y desempeña un papel fundamental en la formación ósea y el equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular en el desarrollo esquelético.

RUNX2, factor de transcripción esencial para la diferenciación de osteoblastos, desempeña un papel significativo en la patogénesis del osteosarcoma (OS) (Li et al., 2015). Actúa predominantemente como un oncogén ya que se han demostrado niveles elevados de número de copias de ADN, ARN y proteína de RUNX2 en OS (Martin et al., 2010). La expresión de RUNX2 se correlaciona con metástasis y una mala respuesta a la quimioterapia en OS (Lucero et al., 2013).

### Células madre epiteliales mamarias:

Las células madre mamarias normales (MaSCs del inglés *mammary stem cells*) son células multipotentes que se auto-renuevan y dan origen a las líneas luminal y basal del epitelio mamario (Van Bragt et al., 2014). Los tres genes RUNX se expresan a diferentes niveles en el epitelio mamario de ratón (Blyth et al., 2010). Runx1 se expresa en mayor medida que Runx2, mientras que la expresión de Runx3 es apenas detectable (McDonald et al., 2014; Owens et al., 2014; van Bragt et al., 2014). RUNX1 y RUNX2 están expresados en las células epiteliales mamarias y ambos afectan el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria normal, lo que sugiere una posible redundancia parcial en este tejido (Van Bragt et al., 2014). Sin embargo, existen funciones antagónicas y específicas de linaje entre ambos factores. RUNX2 promueve el destino alveolar, mientras que RUNX1 favorece el destino luminal, al menos en parte, mediante la represión del factor de transcripción alveolar Elf5 (van Bragt et al., 2014). Además, la eliminación de RUNX1 utilizando MMTV-Cre provoca una reducción de las células luminales maduras, lo que confirma su papel en la diferenciación de estas células. RUNX2 regula el potencial regenerativo de las MaSCs, mientras que RUNX1 y RUNX2 promueven la diferenciación de células epiteliales mamarias maduras, similar a lo observado en líneas hematopoyéticas y en las HFSCs. Un fragmento del elemento de enhancer de RUNX1, conocido como eR1, que regula la expresión de RUNX1 en las HSCs, también estimula la expresión de RUNX1 en células madre luminales y basales mamarias (Matsuo J. et al., 2022). Estudios previos demostraron que eR1 es crucial para la expresión de RUNX1 en células madre epiteliales del corpus y antro del estómago (Matsuo J. et al., 2017). Estos hallazgos subrayan la importancia de eR1 en la expresión de RUNX1 en células madre y confirman que RUNX1 es esencial para la función normal de las células madre en diversos tejidos del organismo. En resumen, los factores RUNX desempeñan un papel tanto en el potencial regenerativo de las MaSCs (Runx2) como en la promoción de la diferenciación de las células epiteliales mamarias maduras (Runx1 y Runx2). Esto es similar a lo observado en los linajes hematopoyéticos y de células madre del folículo piloso (HFSC), donde los factores RUNX apoyan la función de células madre primitivas y, al mismo tiempo, promueven la diferenciación de linajes celulares específicos derivados de estas células madre.

## ***RUNX y cáncer de mama***

### **RUNX1:**

Si bien RUNX1 y CBF $\beta$  han sido estudiados principalmente en el contexto de cánceres hematológicos, en la última década se ha demostrado su implicancia en cáncer de mama, tanto en la supresión tumoral como en la promoción del tumor (Hongyang Yi et al., 2022; Xinyi Chen et al., 2024; Michael Lie-a-ling et al., 2019; Hong D. et al., 2018; Alessandra I. Riggio and Karen Blyth, 2017; Tsung-Chieh Lin, 2022; Khan, A.S. et al., 2023, Adhiraj Roy et al., 2023; Recouvreux et al 2016, Tocci et al 2018, Fernández et al 2023). Muchas evidencias sugieren que RUNX1 se comporta como gen supresor de tumor en el cáncer de mama ER $^+$ , y como oncogén en TNBC:

En un estudio realizado por Ellis y colaboradores, RUNX1 fue identificado como uno de los 18 genes frecuentemente mutados en el subtipo luminal-B (ER $^+$ ) de cáncer de mama (Ellis, M.J. et al. 2012). Un informe independiente encontró dos mutaciones adicionales en RUNX1 y cuatro en CBF $\beta$ . Es importante destacar que todas estas mutaciones se detectaron en tumores luminales ER $^+$  (Banerji et al., 2012). En la misma época, tras la secuenciación del exoma completo de 510 tumores de mama, The Cancer Genome Atlas (TCGA) también informó que las 19 mutaciones identificadas de RUNX1 en este estudio se encontraron en los subtipos luminal A/B (ER $^+$ ) y en el subtipo enriquecido en HER2, mientras que ninguna estuvo presente en el subgrupo tipo basal (Cancer Genome Atlas, 2012). Nik-Zainal y sus colegas demostraron que tanto RUNX1 como CBFB se encontraban entre los 50 principales de un total de 93 genes con riesgo de adquirir mutaciones impulsoras en el cáncer de mama no-TNBC (Nik-Zainal, S. et al., 2016).

El trabajo del laboratorio de grupo de Frenkel ha demostrado que la pérdida de RUNX1 en células de cáncer de mama ER $^+$  facilita la activación de  $\beta$ -catenina inducida por estrógenos a través de la supresión de la proteína de andamiaje AXIN1 (Chimge et al., 2016). Esto resalta el papel de RUNX1 como un supresor tumoral en el cáncer de mama ER $^+$ , y su mecanismo sugiere estar relacionado, al menos en parte, antagonizando la supresión de AXIN1 mediada por estrógenos. Si este es el caso en el cáncer de mama ER $^+$ , es posible que RUNX1 tenga el efecto opuesto en el cáncer de mama ER $^-$ . La ausencia de estrógenos podría inducir a RUNX1 a promover la proliferación celular en el cáncer de mama ER $^-$  mediante la inactivación de AXIN1. Como consecuencia, se activaría la  $\beta$ -catenina, lo que estimularía la señalización WNT (Nur Syamimi Ariffin, 2022).

La pérdida de RUNX1 en células epiteliales mamarias MCF10A y de cáncer de mama ER<sup>+</sup> MCF7 provoca la activación de un fenotipo de EMT y CSC. RUNX1 suprime la eficiencia de formación de esferoides tumorales y la subpoblación de CSCs. Además, la expresión ectópica de RUNX1 reduce la migración y la invasión *in vitro*, así como el crecimiento tumoral en vivo (Hong et al., 2017; Hong et al., 2018).

De manera independiente, el laboratorio del grupo de Ito determinó que RUNX1 ejerce protección contra EMT en la línea MCF10A al antagonizar los efectos oncogénicos de YAP1, un cofactor de transcripción implicado en la metástasis del cáncer de mama (Kulkarni, M. et al., 2018). Asimismo, el complejo RUNX1-CBF $\beta$  fue capaz de prevenir el potencial de migración de la línea celular de cáncer de mama ER<sup>+</sup> MCF7 de manera dependiente del ER (Pegg et al., 2019). Los estudios de estos laboratorios son consistentes con el concepto de que RUNX1 es un potente supresor de EMT y de las CSC en el epitelio mamario normal y en líneas tumorales mamarias ER<sup>+</sup>. Por lo tanto, junto con los datos genéticos, la creciente evidencia en líneas celulares y modelos de ratón establece el concepto de que RUNX1 tiene una actividad de supresor tumoral en el subtipo luminal ER<sup>+</sup>.

Por el contrario, hay evidencia de sobreexpresión de RUNX1 funcional en varios casos de cáncer de mama ER<sup>-</sup> y triple negativo, lo que respalda un papel pro-oncogénico de RUNX1 correlacionado con un mal pronóstico y menor supervivencia (Hongyang Yi et al., 2022; Xinyi Chen et al., 2024; Michael Lie-a-ling et al., 2019; Hong D. et al., 2018; Alessandra I. Riggio and Karen Blyth, 2017; Tsung-Chieh Lin, 2022; Khan, A.S. et al., 2023, Adhiraj Roy et al., 2023), como se detalla en las siguientes evidencias:

RUNX1 se encontró asociado con super-enhancers vinculados a oncogenes y genes relacionados con la patogénesis del cáncer, específicamente en una línea celular de cáncer de mama ER<sup>-</sup> (Hnisz D. et al., 2013; Browne et al., 2015). Un estudio de microarrays de tejidos (TMA por sus siglas en inglés *TissueMicroArrays*) mostró una correlación positiva entre la expresión de RUNX1 y un peor pronóstico/supervivencia global, específicamente en los subgrupos ER<sup>-</sup> y triple negativo. De hecho, un análisis multivariado retrospectivo indicó que la expresión de RUNX1 podría actuar como un marcador pronóstico independiente en este grupo de pacientes indicando que a mayor expresión de RUNX1 en el tumor primario correlaciona con un peor pronóstico (Ferrari et al., 2014).

Los estudios de TMA realizados por Browne y colegas también sugirieron que la expresión de RUNX1 estaba elevada en un subconjunto de carcinomas ductales *in situ* y carcinomas ductales invasivos. Este hallazgo fue respaldado por la observación de que la expresión de RUNX1 se correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad en el modelo

murino de cáncer de mama MMTV-PyMT (Browne et al., 2016; Browne et al., 2015). La capacidad invasiva de las células aisladas de este modelo murino pudo ser reprimida mediante el *knock down* de la expresión de Runx1 (Browne et al., 2015).

Nuestro grupo reportó que RUNX1 regula positivamente la expresión del oncogén RSPO3 (*R-Spondin 3*) y negativamente la del gen supresor de tumor GJA1 (*Gap Junction protein Alfa 1*), promoviendo la migración celular en líneas celulares murinas y humanas de TNBC (Recouvreux et al., 2016). Además, la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX1 por una construcción dominante negativa en la línea celular de TNBC MDA-MB-231 mostró un fenotipo menos agresivo reduciendo su capacidad migratoria (Recouvreux et al., 2016). Se reportó también que los factores RUNX1/2 y CBF $\beta$  promueven la plasticidad fenotípica y son esenciales para mantener el fenotipo mesenquimal e invasivo en líneas de cáncer de mama TNBC (Ran et al., 2020).

De manera similar, nuestro grupo reportó que la interacción entre RUNX1 y FOXP3 regula la expresión de genes asociados al cáncer de mama. Mientras que en células epiteliales mamarias normales FOXP3 inhibe físicamente la actividad transcripcional de RUNX1, su desregulación en el cáncer de mama llevaría a la activación inducida por RUNX1 del oncogén RSPO3 y a la represión del gen supresor tumoral GJA1 (Recouvreux et al., 2016). Recientemente nuestro grupo determinó que el receptor de andrógenos (RA) regula positivamente la expresión de RUNX1 en un modelo de células circulantes de tumor respondedoras a andrógeno (RA $^+$ ) (líneas MDA-MB-453 y SUM-159PT) así como en muestras derivadas de pacientes y xenógrafos derivados de pacientes (*Patient-Derived Xenograft* o PDX por sus siglas en inglés), es decir tumores humanos implantados en la almohadilla de grasa de ratones inmunocomprometidos. En particular, observamos que la reducción en la actividad transcripcional de RUNX1 aumenta la sensibilidad de líneas celulares TNBC-RA $^+$  a drogas quimioterapéuticas y antiandrogénicas tales como paclitaxel y enzalutamida, respectivamente (Fernández et al., 2023).

Muy recientemente, RUNX1 (y también RUNX2) fue identificado mediante un análisis epigenético de tumores mamarios murinos como altamente sobreexpresado en fibroblastos asociados al cáncer (CAF). Los autores extrapolaron sus hallazgos mostrando que RUNX1 se expresa en fibroblastos de cáncer de mama humano, pero no en tejido mamario normal (Halperin, C. et al., 2022). Estos CAF son componentes del microambiente tumoral que desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral, la resistencia a los fármacos y la metástasis (Ralf-Peter Czokay et al., 2022).

Todos estos hallazgos demuestran de manera consistente cómo el papel de RUNX1 depende del subtipo de cáncer de mama ( $ER^+$  vs.  $ER^-$ ) y que su efecto sobre las células tumorales varía según el contexto en el que se exprese (Khan, A.S. et al., 2023). A lo largo de esta tesis trabajamos con líneas celulares TNBC investigando el rol de RUNX como oncogén.

### RUNX2:

RUNX2 ha demostrado antagonizar la señalización del ER y desempeñar un papel supresor de tumores en las células de cáncer de mama MCF7 y en pacientes con cáncer de mama  $ER^+$  (Chimge, N.-O. et al., 2013; Chimge, N.-O. et al., 2012; Khalid, O. et al., 2008). Sin embargo, en los conjuntos de datos transcriptómicos del cáncer de mama, la expresión aumentada de RUNX2 se asocia tanto con subtipos  $ER^+$  como  $ER^-$ , sugiriendo un papel pro-oncogénico en estas células. Aunque su función en el cáncer de mama es dependiente del contexto, RUNX2 se ha consolidado como un importante impulsor de la metástasis del cáncer de mama (Adhiraj Roy et al., 2023; Deltcheva and Nimmo, 2017; Mevel et al., 2019; Khan, A.S. et al., 2023; Xinyi Chen et al., 2024). Como regulador maestro de los osteoblastos y del desarrollo óseo, el aumento de la expresión de RUNX2 se ha vinculado con la metástasis del cáncer de mama al hueso (Javed, A. et al., 2005; Pratap, J. et al., 2008; Pratap, J. et al., 2011; Leong, D.T et al., 2010). En células metastásicas de cáncer de mama, la fosforilación de RUNX2 por AKT mejora su actividad transcripcional y aumenta la expresión de genes relacionados con la invasión tumoral (Pande, S. et al., 2013). Un estudio de Barnes y colaboradores resaltó la importancia de RUNX2 en el crecimiento de células tumorales metastásicas MDA-MB-231 y LCC15-MB dentro del microambiente óseo. En este trabajo, la inactivación genética de RUNX2, eliminando su dominio de transactivación, anuló la capacidad de estas células para regular la diferenciación osteogénica en células del estroma de médula ósea *in vitro* y su habilidad para inducir enfermedad osteolítica *in vivo* (Barnes, G.L. et al., 2004). Esto fue apoyado por otro estudio, donde se demostró que RUNX2, en conjunto con CBF $\beta$ , inhibe la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos a través de la inducción de la secreción de esclerostina en células MDA-MB-231 (Mendoza-Villanueva, D. et al., 2011). La esclerostina es un antagonista de la vía de señalización Wnt en osteoblastos y afecta el desarrollo óseo, lo que podría facilitar el crecimiento de tumores secundarios en el hueso (Mendoza-Villanueva, D. et al., 2011; Rutkovskiy, A. et al., 2016). Además, varios genes implicados en la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea, como CSF2, IL8, SPP1, SPHK1, PTHLH y diversas

metaloproteinasas de matriz (MMPs), son regulados por RUNX2 en células de cáncer de mama y próstata (Pratap, J. et al., 2006; Pratap, J. et al., 2008; Mendoza-Villanueva, D. et al., 2011; Pratap, J. et al., 2005; Baniwal, S.K. et al., 2010; Akech, J. et al., 2010). La sobreexpresión de Runx2 se ha asociado con TNBC, y su expresión aberrante muestra una correlación positiva con varias proteínas vinculadas a la metástasis y EMT, como MMP9, MMP13 y proteínas sialoproteicas óseas (Pratap et al., 2011; Rooney et al., 2017). RUNX2 y CBF $\beta$  también son críticos para la expresión de osteopontina (IBSP), IL11 y GM-CSF (CFS2) en células metastásicas de cáncer de mama, promoviendo la destrucción ósea mediada por osteoclastos y permitiendo la invasión del microambiente óseo por células tumorales (Mendoza-Villanueva, D. et al., 2011; Bonewald, L.F. et al., 2008; Kang, Y. et al., 2003). Esto sugiere que las células de cáncer de mama que expresan RUNX2 y CBF $\beta$  pueden explotar los factores de crecimiento involucrados en la homeostasis de la formación de hueso para favorecer la osteoclastogénesis y el crecimiento metastásico en hueso. El análisis inmunohistoquímico de tumores primarios ha correlacionado la expresión elevada de RUNX2 con fenotipos agresivos en cáncer de mama humano (Onodera, Y. et al., 2010). RUNX2 ha sido particularmente asociado con líneas celulares invasivas y ER-negativas del subtipo basal, como MDA-MB-231, HCC38 y MDA-MB-157, en las cuales también se observa una alta expresión de CBFB (Lau, Q.C. et al., 2006). Además, en un análisis extenso de microarreglos de tejidos (TMA) de cáncer de mama humano, una alta expresión de RUNX2 se correlacionó con enfermedad ER-negativa y mal pronóstico en pacientes, además de inducir cambios preneoplásicos en tejido mamario murino no transformado (McDonald, L. et al., 2015). En experimentos *in vitro* con células MCF7 ER $^+$ , RUNX2 promovió EMT y metástasis mediante la regulación de SNAI2 a través de las vías Wnt/TGF $\beta$ . Curiosamente, este estudio encontró una correlación inusual entre la alta expresión de RUNX2, SNAI2 y ER $\alpha$  (Chimge, N.-O. et al., 2011). RUNX2 también promueve la formación de tumorsferas, un marcador de capacidad de autorrenovación, y en asociación con TAZ, aumenta la liberación de E-cadherina soluble, que a su vez puede cooperar con HER2 en la progresión del cáncer de mama (Brusgard, J.L. et al., 2015).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Durante el desarrollo de esta tesis de doctorado investigamos el rol de RUNX en la biología tumoral, focalizándonos en la resistencia a quimioterapia en líneas celulares humanas TNBC teniendo en cuenta la diversidad de subpoblaciones tumorales o heterogeneidad intratumoral. Para ello, propusimos los siguientes **objetivos particulares**:

**Objetivo particular 1:** Evaluar la relevancia de la actividad transcripcional de RUNX en procesos tumorales.

**Objetivo particular 2:** Estudiar el impacto sobre la sensibilidad de las líneas celulares TNBC humanas a drogas quimioterapéuticas cuando la actividad transcripcional de RUNX está reducida.

**Objetivo particular 3:** Investigar posibles mecanismos involucrados en la modulación de la sensibilidad a drogas por RUNX.

**Objetivo particular 4:** Investigar posibles mecanismos de modulación externa de la expresión de RUNX en TNBC.

Nuestra **hipótesis de trabajo** propone que RUNX promueve la resistencia a quimioterapia en distintas subpoblaciones que componen la heterogeneidad intratumoral reduciendo la eficacia de los tratamientos en TNBC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## **I. Drogas**

Las drogas utilizadas a lo largo del trabajo fueron: las drogas quimioterapéuticas comúnmente usadas en la clínica para los pacientes TNBC: doxorubicina (gentilmente cedida por Claudia Lanari) y paclitaxel (Cell Signaling Technology #9807); el inhibidor comercial de la actividad transcripcional de RUNX1 AI-10-104 (Glixx Lab, GLXC-20705); el agonista del receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés *Glucocorticoid Receptor*), dexametasona (Sigma D1756); y el antagonista del receptor de progesterona (también anti-glucocorticoide), mifepristone o RU-486 (Sigma M8046).

## **II. Líneas celulares**

Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron las líneas celulares humanas TNBC MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MDA-MB-453. Las tres líneas derivan de una metástasis pleural de pacientes con cáncer de mama. Las líneas MDA-MB-231/453 son de tipo mesenquimal, mientras que la MDA-MB-468 es de tipo basal. Las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 fueron cedidas gentilmente por la Dra. Roxana Schillaci (Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME), la Dra. Cecilia Pérez Piñero (Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME) y por el Dr. Luciano Vellón (IBYME). Para éstas se utilizó el medio DMEM F12 (GIBCO) suplementado con 10% SFB (Serendipia Lab) y 1% estreptomicina-penicilina-anfotericina B (GIBCO) para el crecimiento y mantenimiento de las células. La línea MDA-MB-453 fue gentilmente cedida por la Dra. Jennifer Richer (Denver Colorado, USA) y fueron mantenidas en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% SFB. En los experimentos del Objetivo 4, se utilizó suero charcolizado en experimentos que requieren la eliminación de hormonas esteroideas para evaluar el efecto de tratamientos específicos sin interferencia hormonal. Las líneas celulares empleadas se cultivaron en estufa gaseada a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, saturada de humedad. Para repicar las células adherentes, se usó tripsina 1X (GIBCO). Se usaron cultivos celulares con un máximo de 10 pasajes continuos. Las células se testearon regularmente para mantener controlada la posible contaminación con micoplasma mediante la técnica de PCR.

A lo largo de la tesis utilizamos las mismas líneas celulares pero provenientes de distintos laboratorios: utilizamos MDA-MB-231 del laboratorio de Roxana Schillaci y del laboratorio de Cecilia Pérez Piñero, y MDA-MB-468 del laboratorio de Roxana Schillaci y del laboratorio de Luciano Vellón. Con cada línea calculamos el IC50 de cada droga

utilizada, pero este valor varió según el origen de cada una. En la sección de Resultados, mostramos el valor de IC50 de las MDA-MB-231 de Cecilia Pérez Piñero y las MDA-MB-468 de Luciano Vellón, pero si algún experimento se realizó con la otra de distinto origen, se aclarará su valor de IC50. Los cambios en las líneas se debieron a que alcanzaron fenotipos inestables por el número de pasajes. Todas las líneas celulares fueron autenticadas por el Servicio de Huellas Digitales Genéticas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, mediante un análisis de polimorfismos de ADN. El perfil genético entregado estudia una serie de marcadores autosómicos, el cual coincidió en un 100% con bases de datos del perfil genético de cada línea.

### **III. Transfección de células**

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron: DN-Runx1-PCDNAC3.1 (DN: dominante negativo) y PCDNA3.1 (V: control Vacío). El plásmido DN consta del ADNc de RUNX1 que contiene la inserción de una secuencia denominada Linker (GATCGAGTTAACCATGGTTAACTC) que contiene un codón stop prematuro. La proteína resultante de este ADNc heterodimeriza con el RUNX1 endógeno bloqueando su actividad transcripcional. Su construcción fue previamente reportada en la tesis de licenciatura de este laboratorio de la Dra. Sol Recouvreux y publicada en doi: 10.18632/oncotarget.6771.

#### *a- Transformación de bacterias: amplificación del plásmido*

Se incubaron 50 ul de bacterias competentes con 100 ng de plásmido por 30 minutos en hielo. Luego, se les produjo un shock térmico pasándolas directamente del hielo a un bloque térmico a 42°C por 90 segundos y regresándolas al hielo por 5 minutos. A continuación, se les agregó 1 ml de LB y se incubó por 1 hora a 37°C. Luego se centrifugaron a 3000 g a temperatura ambiente por 1 minuto, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 50 ul de medio LB y se sembraron en una placa con medio LB-agar-ampicilina. Las placas con las bacterias se incubaron entre 12 y 24 horas a 37°C, hasta la aparición de colonias visibles a ojo desnudo.

### *b- Midiprep: purificación del plásmido*

A partir de una colonia bacteriana aislada se preparó un cultivo en 25 ml de medio líquido (LB-ampicilina). Los pasos que siguen son los recomendados por el fabricante y correspondientes al kit *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega)*:

Luego de una noche de incubación (ON por sus siglas en inglés *OverNight*) en shaker a 37°C, las bacterias fueron centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g a 4°C. Se resuspendió el pellet en 3 ml de Solución de Resuspensión Celular (tiene agregada RNAsa) y se le agregó 3 ml de Solución de Lisis Celular, se mezcló por inversión 4 veces y se incubó por 5 minutos. Se agregó 3 ml de Solución de Neutralización y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. A continuación, el lisado bacteriano se centrifugó por 15 minutos a 14.000 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo sin tomar el precipitado blanco. Se le agregó 10 ml de la Resina de Purificación de ADN a la solución de ADN obtenida y se mezcló. Se insertó la columna en un equipo que ejerce vacío y se transfirió la mezcla ADN/resina en la columna aplicándole vacío. Se le agregó 15 ml de Solución de Lavado a la columna y se le aplicó vacío de nuevo. Este último paso se repitió. Se colocó el reservorio de la columna en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10.000 g por 2 minutos para remover cualquier residuo que pudiera haber quedado (ese tubo eppendorf se descartó). Se volvió a colocar el reservorio de la columna en un tubo eppendorf nuevo, se le agregó agua precalentada a 65°C y se volvió a centrifugar para eluir el ADN y obtenerlo en el tubo eppendorf. La masa de ADN y su calidad se cuantificó utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se lo corrió en un gel de agarosa 1% en Buffer TAE para revisar su integridad. Se guardaron las muestras a -20°C.

### *c- Ensayo de transfección*

Se sembraron 100.000 células MDA-MB-231 por well en una placa p12 y se esperó 24 horas hasta que las células alcanzaran un 70% de confluencia. La transfección se llevó a cabo con LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen, 11668-027) o PEI PolyAR o FUGENE (Promega, E231A):

Con Lipofectamine 2000: Se las sometió a una hora de hambreado (solo OPTIMEM, sin SFB). Para cada well a transfectar, se preparó una solución I con 1,7 ul de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y 98,3 ul de OPTIMEM (GIBCO) y una solución II con 2 ug de plásmido en OPTIMEM (c.s.p. 100ul). Se incubaron estas soluciones durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó la solución II a la I gota a gota y se incubó esta mezcla por 20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se lavaron las células dos veces con PBS 1x y se les agregó la mezcla contenido los complejos de

plásmido con lipofectamina. Se incubaron las células a 37°C durante 6 horas, luego de lo cual se agregó 1 ml de medio completo con o sin doxorubicina 0,1uM. Se esperaron 48 hs para contar las células.

Con PEI: Para cada well a transfectar, se preparó una mezcla con 2 ug de plásmido, 6 ug de solución PEI y volumen suficiente de OPTIMEM para tener un volumen final de 20ul. La mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente luego de los cuales se le agregó 180 ul de OPTIMEM. Al cabo de este tiempo se lavaron las células dos veces con PBS 1x y se les agregó la mezcla conteniendo los complejos de plásmido con PEI. Se incubaron las células a 37°C durante 6 horas, luego de lo cual se agregó 1 ml de medio completo con o sin doxorubicina 0,1uM. Se esperaron 48 horas para contar las células.

Con FUGENE: Para cada well a transfectar, se preparó una mezcla de 800 ng de plásmido y cantidad suficiente de OPTIMEM para un volumen de 38 ul, que fue mezclada por vortex y sometida a una centrifugación a máxima velocidad y corta (segundos) para obtener un pellet de material. Se le agregó 2 ul de FUGENE y se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se agregaron 560 ul de medio completo en cada well, seguido de los 40 ul de la mezcla gota a gota. Se incubaron a 37°C durante 6 horas y luego fueron tratadas con la droga correspondiente (Doxo y/o DN. Ver Figura 41). Se esperaron 48 hs para contar las células.

#### **IV. Generación de mamósferas**

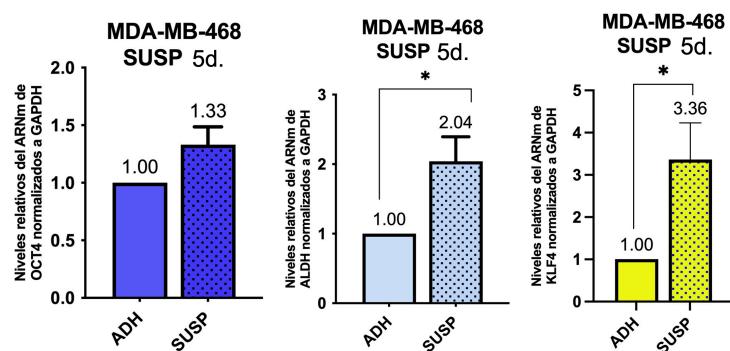
Para generar mamósferas, las células MDA-MB-231 fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Se resuspendieron en medio base DMEM F12 de modo tal que quedaran bien desagregadas, y se plaquearon 5000 células/ml (pocas células para que se forme una esfera a partir de una única célula y no se agreguen entre ellas) en placas no adherentes para que efectivamente crezcan en suspensión. Cada tres días se agregó medio fresco con factores y se re-trató con la droga correspondiente.

El medio para favorecer la formación de esferas está compuesto por: DMEM F12 medio base; L-glutamina (Gibco, 25030-081) 1%; antibiótico-antimicótico 1%; metilcelulosa (Sigma, M0512) 0,24%; b27 (Gibco, 17504-044) 2%; y los factores de crecimiento hEGF (Sigma, E9644; disuelto en ácido acético 10 mM) y hbFGF (Sigma, F0291; disuelto en Tris 20 mM pH 7) 20 ng/ml que se agregan en el momento de uso. Este protocolo fue adaptado de Iglesias *et al.*, 2013.

## V. Generación del modelo de células en suspensión forzada

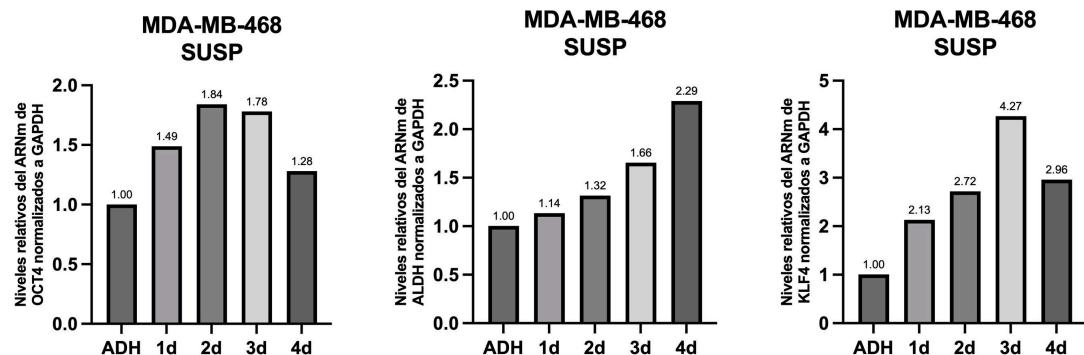
Para generar el cultivo de células creciendo en suspensión forzada que simula a células madre tumorales en circulación (Barton *et al.*, 2017) se preparó una solución de poli-2-hidroxietil metacrilato (poly-HEMA, Sigma) en etanol 95% cuya concentración final fue 12 mg/ml. Previo a su uso, la solución se calentó a 60-65°C con agitación y las placas P6 necesarias se incubaron en estufa a 55°C por al menos 1,5 horas antes. Se agregó 1 ml de la solución por well bajo campana de cultivo celular y las placas se dejaron durante la noche en estufa a 55°C para que el etanol se evaporara correctamente y el revestimiento quedara homogéneamente distribuido. Al día siguiente se retiraron las placas de la estufa listas para usar o almacenar hasta su uso. Al momento de usarlas, se lavaron las placas con 1 ml de PBS 1X por pocillo para retirar cualquier impureza no deseada y se plaquearon 450.000 células por pocillo de placa p6.

Ya que este modelo de cultivo adquiere un fenotipo *stem-like*, lo validamos midiendo la expresión de genes stem después de cuatro días de estar en suspensión: el mRNA de los genes stem *OCT4*, *ALDH* y *KLF4* se incrementaron en la población suspendida con respecto a la adherida. A lo largo de la tesis, cada vez que se hizo un experimento con el modelo de células en suspensión, se usó la nomenclatura “número1+número2” para llamar a la cantidad de días en que se dejaron las células en suspensión sin ningún tratamiento para que adquieran el fenotipo *stem* (número 1) y la cantidad de días que recibieron algún tratamiento (número 2).



**Figura 12.** Expresión relativa del ARNm de los genes stem *OCT4*, *ALDH* y *KLF4* medida por qPCR para validar el modelo de células en suspensión (SUSP) en MDA-MB-468. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de estos genes en las mismas células crecidas en condiciones estándar (ADH). Se graficó la media de las veces de cambio  $\pm$  ES ( $n=4$ ). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ .

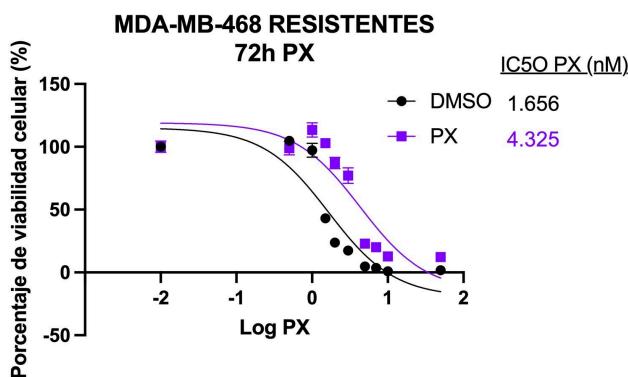
Para saber a partir de qué momento las células en suspensión adquieren un fenotipo *stem*, se midió la expresión de estos genes a distintos tiempos.



**Figura 13.** Expresión relativa del ARNm de los genes stem *OCT4*, *ALDH* y *KLF4* medida por qPCR en las MDA-MB-468 en función del tiempo de suspensión de las células. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de estos genes en las mismas células crecidas en condiciones estándar. Se graficó las veces de cambio con respecto al modelo de adheridas (n=1).

## VI. Generación de células resistentes a drogas quimioterapéuticas

Tanto las MDA-MB-231 como las MDA-MB-468 fueron tratadas con dosis crecientes de paclitaxel o doxorubicina comenzando por una dosis muy baja (0,5nM y 0,01uM respectivamente) que prácticamente no tienen efecto en la viabilidad de las células (Ver figura 34: IC50 doxo o PX en cada línea) e incrementándose cada tres semanas aproximadamente. Cuando más del 50% de las células de la placa se encontró afectada por la droga, se renovó el medio por medio fresco sin droga y se mantuvo hasta que las células se recuperaron y volvieron a tener su fenotipo normal (población “resistente”). En paralelo, se mantuvo una población de células control (población “control”) a la que se trató con el vehículo de cada droga (agua para doxorubicina y DMSO para paclitaxel) cada vez que se trataba con droga a la otra población celular. Para comprobar la resistencia, se realizaron varios ensayos de cristal violeta donde se trató a ambas poblaciones con dosis crecientes de la droga y se calculó el valor de IC50. Cuando el valor de IC50 de la droga de la población resistente fue considerablemente mayor al de la población control, se consideró resistente. Se pudo generar una línea resistente a PX (MDA-MB-468) luego de tres meses de tratamiento, cuando las células fueron tratadas por última vez con PX 10nM.



**Figura 14.** Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de concentraciones crecientes de PX en la línea MDA-MB-468 control y MDA-MB-468 resistente a PX. Valor de IC<sub>50</sub> obtenido a partir de una transformación logarítmica de las concentraciones de PX y una regresión no lineal en GraphPad.

Estas líneas celulares resistentes obtendidas también fueron autenticadas por el Servicio de Huellas Digitales Genéticas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. El perfil genético coincidió en un 100% con bases de datos del perfil genético de la línea MDA-MB-468.

## VII. Ensayo de viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad de las células se llevó a cabo el ensayo de cristal violeta, para el cual se plaquearon, en una p96, 4500 células por well en un volumen final de 100 ul; y una curva de número de células en otra p96 para obtener una ecuación de número de células en función de la absorbancia, a partir de la cual poder hacer una regresión.

Después de los tratamientos que recibieron las células, el medio fue descartado y se agregaron 50 ul de formalina 10%, quedando la placa en agitación durante 15 minutos para fijar las células que quedaron adheridas (viables). Luego, esa formalina fue descartada y se la placa fue incubada con 50 ul de cristal violeta 0,5%-metanol 25% durante 15 minutos en agitación para teñir las células. Por último, el cristal violeta fue descartado y la placa se dejó secando. Una vez seca, los cristales remanentes se disolvieron en 50 ul de ácido acético 5% y se midió la absorbancia a 540/640 nm en el equipo Tecan infinite 200Pro. El mismo procedimiento se usó para la p96 con la curva de número de células al día siguiente de haberla plaqueado.

## VIII. Ensayo de apoptosis

Para evaluar y cuantificar la apoptosis temprana, la apoptosis tardía y la necrosis de las células frente a distintos tratamientos, se llevaron a cabo ensayos de apoptosis con tinción

de Anexina V Cy5 (BD Pharmingen, 559934) e Ioduro de Propidio (Invitrogen, P1304MP). Se plaquearon 150.000 células MDA-MB-468 por well y 130.000 MDA-MB-231 en un volumen final de 2 ml en una p6 para el modelo de adheridas, y 450.000 MDA-MB-468 y 500.000 MDA-MB-231 por well en un volumen final de 2 ml en una p6 coateada antes con poly-HEMA para el modelo de suspendidas. Luego del tiempo requerido para los tratamientos, se recolectó el medio y las células correspondientes a cada tratamiento en un tubo eppendorf. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se lavaron con PBS 1X y se volvieron a centrifugar. El pellet de cada tubo fue resuspendido en 300 ul de binding buffer 1X conteniendo 2,5 ul de Anexina y se incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 ul de binding buffer 1X conteniendo 1 ul de ioduro de propidio 1 mg/ml y se vortexearon para homogeneizar la muestra.

La Anexina Cy5 se excita a 625-650 nm y emite a 670 nm, por lo tanto se usa el filtro APC. El ioduro de propidio se excita a 535 nm y emite a 617 nm, por lo tanto se usa el filtro PE. Estas fluorescencias fueron detectadas en los citómetros de flujo BD FACSAria II y BD Accuri C6 Plus del centro de citometría de FCEN-UBA y los datos fueron analizados en el programa FlowJo.

Como control de apoptosis se usaron H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10V durante 3 horas, doxorubicina 0,5 uM durante 24 horas o paclitaxel 10 nM durante 24 horas. Para el control de autofluorescencia se usó una mezcla de células vivas y células apoptóticas, para el control de Anexina se usó la misma mezcla teñidas solo con Anexina y para el de ioduro de propidio, incubadas sólo con ioduro de propidio. Las compensaciones celulares del equipo fueron hechas por el técnico del citómetro de flujo.

## **IX. Ensayo de migración**

Se plaquearon 50.000 células de MDA-MB-468 en un volumen de 200 ul de medio base DMEM F12 en cada inserto (Millicell, PTEP24H48) y éstos fueron colocados sobre los wells de una p24 conteniendo 900 ul de medio DMEM F12 20% SFB (utilizado como quimioatractante). La placa fue incubada en la estufa a 37°C durante 24 horas para que ocurriera la migración. Transcurrido ese tiempo, la placa fue retirada de la estufa. Los insertos fueron sumergidos en PBS 1X y luego en 500 ul de metanol durante 20 minutos. Luego, los insertos fueron transferidos a otro well con cristal violeta 0,5%-metanol 25%. Despues de media hora, se realizaron varios lavados con agua destilada para remover el excedente del colorante. Con un hisopo se limpió la membrana del inserto por el lado de

adentro (donde fueron sembradas las células) para remover aquellas células que no migraron y el inserto se dejó secar por varias horas. Una vez seco, se cortó dicha membrana y se la montó en un portaobjetos con un cubreobjetos encima sellado con esmalte. Las fotos de campo claro se tomaron con un microscopio óptico invertido Zeiss Ax10 con el aumento 10X (NA=0.25) y fueron analizadas con el programa *ImageJ 2.9.0*. El servicio fue brindado por el Centro de Microscopía de Fluorescencia “Gregorio Weber”, ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo supervisión de la Dra. Victoria Repetto. Se contaron las células teñidas con la herramienta del contador. Como control negativo, se colocó un inserto con células sobre un well con DMEM F12 pero sin quimioatractante (0% SFB).

## X. Ensayo de PCR

### a- Extracción de RNA

Se partió de una placa de cultivo P6 con células crecidas en confluencia, que fue colocada en hielo. Se lavaron las células adheridas con PBS 1X, se les agregó 500 ul de TRI REAGENT (Molecular Research Center, TR 118) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación se pasó el lisado a un tubo eppendorf y se le agregó 100 ul de cloroformo a cada muestra, se la agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN agregando 250 ul de isopropanol e incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 75% y se volvió a centrifugar (7500 g durante 5 minutos) hasta que el pellet quedara totalmente seco. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en agua milliQ autoclavada.

Para células en suspensión, las células se levantaron y se centrifugaron por 5 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado con PBS 1X. Se centrifugó nuevamente y el pellet obtenido fue resuspendido en 500 ul de TRI REAGENT. Los pasos posteriores son idénticos a los ya mencionados.

La masa de ARN y su calidad de pureza se cuantificó utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Muestras cuya relación 260/280 y/o 260/230 estuviese por debajo de 1,5 fueron descartadas. Las muestras fueron conservadas a -70°C para su posterior uso.

### *b- Retrotranscripción*

A partir de los extractos de ARN se realizó una retrotranscripción (RT) a ADNc usando los siguientes reactivos con su correspondiente concentración final entre paréntesis:

**MIX 1:** Oligo dT IDT (0,025 ug/ul) + 2 ug RNA + cantidad suficiente de agua milliQ para Vf=10ul.

**MIX 2:** Buffer Promega M531A (1X) + dNTPs INBIO HW K1404 (0,5 mM cada uno) + retrotranscriptasa MMLV Promega M1701 (10 unidades/ul) + cantidad suficiente de agua milliQ para Vf=10ul.

La **MIX 1** fue incubada en la termocicladora MiniAmp Plus (Applied Biosystems) por 5 minutos a 70°C para permitir que tanto el ARN como los oligo-dT se linealicen e hibriden entre si. Transcurrido ese tiempo, se pasaron rápidamente a hielo para evitar que se formen estructuras secundarias, se agregó la **MIX 2** y se incubaron nuevamente en la termocicladora por 1,5 horas a 42°C para que ocurra la RT obteniendo de este modo el ADNc de todos los ARN mensajeros (ARNm) celulares. Las muestras fueron conservadas a -20°C para su posterior uso.

### *c- qPCR*

A partir de los ADNc obtenidos en la RT se realizaron diversas PCR cuantitativas en tiempo real (qPCR), usando la siguientes mezcla de reactivos con su correspondiente concentración final entre paréntesis:

Buffer Invitrogen 11615-010 (1x)

MgCl<sub>2</sub> Invitrogen, 11615-010 (3 mM)

dNTPs INBIO HW K1404 (0,2 mM cada uno)

Polimerasa TAQ Invitrogen 11615-010 (0,03 unidades/μL)

SYBR Green Sigma, S9430 (1x)

Primers (0,4 uM cada uno)

Agua milliQ, cantidad suficiente para Vf=14 ul

Se colocó la **MIX** en los pocillos de placa p96 para PCR y luego el ADNc (1ul). Cada muestra se midió por triplicado (técnico). La qPCR se realizó en la termocicladora StepOnePlus (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa:

Inicio a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, annealing a 60°C por 20 segundos y elongación a 72°C por 25 segundos; seguido por una curva de melting.

Se utilizó a *GAPDH* como el gen de referencia para normalizar la expresión del resto de genes de interés en cada muestra, corrigiendo las variaciones que pudieran existir y que no se deban al tratamiento en sí. Los datos obtenidos se visualizaron en el programa *StepOne Software v2.3* y la expresión relativa de los genes se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  donde  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{TARGET} - Ct_{REFERENCIA})_{Tratamiento} - (Ct_{TARGET} - Ct_{REFERENCIA})_{Sin tratamiento}$ .

#### *d-Secuencias de Primers*

GEN	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
<i>GAPDH</i>	5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3'	5'-GTC TTC TGG GTG GCA GTG ATG-3'
<i>RUNX1</i>	5'-ACT CGG CTG AGC TGA GAA ATG-3'	5'-GAC TTG CGG TGG GTT TGT G-3'
<i>KLF4</i>	5'- CGA ACC CAC ACA GGT GAG AA -3'	5'- TAC GGT AGT GCC TGG TCA GTT C -3'
<i>ALDH4A1</i>	5'-CCT GGA GCT TGG AGG AAA GA-3'	5'-CTT CTT AGC CCG CTC AAC AC-3'
<i>OCT4</i>	5'-CAG GCC CGA AAG AGA AAG C-3'	5'-CCA CAC TCG GAC CAC ATC CT-3'
<i>NR2F1</i>	5'-AGC TCA AGG CGC TAC ACG TC-3'	5'-GCT CCT CAC GTA CTC CTC CAG T-3'
<i>GJA1</i>	5'-GCC TGA ACT TGC CTT TTC AT-3'	5'-CTC CAG TCA CCC ATG TTG C-3'
<i>RUNX2</i>	5'-CTG TGG TTA CTG TCA TGG CG-3'	5'-AGG TAG CTA CTT GGG GAG GA-3'
<i>ABCC1</i>	5'-CGA CAT GAC CGA GGC TAC ATT-3'	5'-AGC AGA CGA TCC ACA GCA AAA-3'
<i>ABCG2</i>	5'-TAT AGC TCA GAT CAT TGT CAC AGT C-3'	5'-GTT GGT CGT CAG GAA GAA GAG-3'
<i>GR</i>	5'-CTG CCC CAA GTG AAA ACA GA-3'	5'-ATG AAC AGA AAT GGC AGA CAT TT-3'
<i>GILZ1</i>	5'-TCT GCT TGG AGG GGA TGT GG-3'	5'-ACT TGT GGG GAT TCG GGA GC-3'

Tabla I: Primers **humanos** usados para ensayos de qPCR.

Cabe aclarar que los primers de *RUNX1* levantan las tres isoformas descriptas: *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*.

## XI. Western-Blot

#### *a- Extracción de proteínas*

Partiendo de placas P6 con células adheridas, éstas se colocaron en hielo y se lavaron con PBS 1X. Se agregó 200  $\mu$ L de *Cracking Buffer* 2X con  $\beta$ -mercaptoetanol 10% v/v por well (confluente al 80-90%). Con el mismo tip se rastillaron las células y se colocaron en

eppendorfs en hielo. Se incubaron por 15 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas y luego se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

#### *b- SDS-PAGE*

Las muestras guardadas a -20°C fueron descongeladas y sembradas en un gel de poliacrilamida 10% embebido en buffer de corrida, en un sistema de electroforesis estándar (BIO-RAD). Se aplicó un voltaje constante de 90 V para el gel concentrador, luego se corrió a 110V durante 30 minutos y finalmente se corrió a 120V constantes hasta caer el frente de corrida. A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 um por 1,5 horas a 300-350 mA constantes en hielo y en buffer de transferencia. Las membranas se bloquearon en leche descremada 5% en T-TBS durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Pasado el tiempo, se lavaron una vez con TBS-T para quitar cualquier resto de leche que pudiera haber precipitado. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. Los anticuerpos usados se detallan a continuación:

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Isotipo IgG</b>
Anti-RUNX1 (Cell Signaling Technology, CST4334)	1:1000 en TBS-T 0,5% BSA	Conejo
Anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-32233)	1:5000 en TBS-T 0,5% BSA	Ratón

**Tabla 4.** Lista de anticuerpos primarios, diluciones utilizadas e isotipo de cada uno.

Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T durante 10 minutos. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1-1,5 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Como los anticuerpos secundarios estaban acoplados a un fluoróforo, dichas membranas se incubaron al resguardo de la luz. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Isotipo IgG</b>
Anti-IgG de conejo acoplado a fluoróforo	1:10000 en TBS-T 0,5% BSA	Burro

IRDye 800 CW (LI-COR, 926-32213)		
Anti-IgG de ratón acoplado a fluoróforo IRDye 800 RD (LI-COR, 926-68070)	1:10000 en TBS-T 0,5% BSA	Cabra

**Tabla 4.** Lista de anticuerpos secundarios, diluciones utilizadas e isotipo de cada uno.

Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T y una vez con TBS durante 10 minutos. Las membranas incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos se dejaron secar al resguardo de la luz por mínimo 3 horas y la señal de fluorescencia fue capturada por medio del analizador Odyssey (LI-COR).

El peso de cada banda obtenida se determinó por comparación con el marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 11812124). Las imágenes obtenidas por fluorescencia fueron visualizadas utilizando el software *Image Studio Lite 5.2* (LI-COR).

## XII. Ensayo *ex-vivo*

Con el objetivo de pasar a un modelo superior en complejidad, se realizó un cultivo de explantos en colaboración con el grupo de la Dra. Cecilia Pérez Piñero. Para esto, dejamos crecer MDA-MB-231 hasta la confluencia, se levantaron y se lavaron 3 veces con medio sin suero. Se prepararon 4 millones de células en 200 ul de medio (sin suero) en un eppendorf guardado en hielo. Se inocularon subcutáneamente en un ratón inmunocomprometido NSG Jackson macho. Al cabo de un mes y medio, el tumor alcanzó casi 70 mm<sup>2</sup> y fue extraído sacrificando al ratón. Con el tumor (explant) sobre una placa conteniendo medio DMEM, cortisol, transferrina y antibiótico gentamicina, se retiró el tejido conectivo y se fue cortando con bisturí y ayuda de una pinza de manera de obtener láminas muy finitas lo más parecidas posible entre sí. Cada tratamiento requiere contar con alrededor de 5 o 6 láminas de tumor, que fueron colocadas sobre una esponja hemostática de colágeno hidrolizado (hemospon, Technew) que sirve como soporte y que a su vez se colocó dentro de un pocillo de una p12. El medio con el tratamiento correspondiente es absorbido por la esponja que permite la llegada uniforme del medio de cultivo a toda la superficie expuesta. Se cerraron las placas con cinta papel y fueron colocadas en la estufa de cultivo durante 48 horas. Pasado este tiempo, se lavaron las láminas de tumor en un pocillo con PBS 1X y posteriormente fueron incubados con eosina durante 3 minutos, lo cual permite la visibilidad de los cortes al momento de realizar la inclusión en parafina. Las láminas pertenecientes a un mismo

tratamiento fueron colocadas en un papel de filtro dentro de un cassette para el armado de los tacos de parafina, y se mantuvieron en formalina Cf 4% hasta ese momento. Por último, estos cassettes fueron enviados al STAN de Asesoramiento integral en el manejo de tejidos y técnicas de Inmunohistoquímica (Código: 5338) del IBYME y analizados allí.

Como control del estado del tumor al momento de ser extirpado del ratón, se usaron unas láminas del mismo sin pasar por las 48 horas de cultivo, que fueron fijadas en formalina Cf 4% para ser enviadas junto con el resto de las muestras.

### **XIII. Ensayo de acumulación de doxorubicina**

La fluorescencia de la doxorubicina fue utilizada para estudiar la acumulación intracelular de dicha droga. Este protocolo fue adaptado de Orlando *et al*, 2019. Dos horas antes de levantar el experimento, se lavaron los wells con PBS 1X y se agregó 1 ml de medio fresco sin drogas. Pasadas las dos horas, se volvió a lavar con PBS 1X y se tripsinizaron las células, las cuales fueron resuspendidas en medio completo y centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar con PBS 1X y a centrifugar. Finalmente, el pellet obtenido de la centrifugación fue resuspendido en 500 ul de 2% SFB en PBS. La fluorescencia de doxorubicina fue evaluada en los citómetros de flujo BD FACSAria II y BD Accuri C6 Plus con el filtro PE; y los datos fueron analizados en el programa FlowJo.

### **XIV. Inmunofluorescencia**

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron en vidrios cubreobjetos de 12 mm montados en placas P12:

Se colocó un vidrio por pocillo de una placa P12 y se irradiaron con UV por al menos 15 minutos antes de ser utilizados. Se sembraron 70.000 células en 1 ml de medio y se incubaron en estufa durante 24 horas. Al día siguiente se lavaron con PBS 1X y se trataron con la droga correspondiente en medio fresco o simplemente se les cambió el medio, ahora en un volumen de 500 ul. Al finalizar el tratamiento, se retiró el medio de los wells y se realizó un lavado de PBS 1X. Bajo campana de extracción se agregaron 400  $\mu$ L de paraformaldehído (Sigma, P6148) 4% filtrado y se dejó reposar por 7 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se descartó el PFA y se realizaron tres lavados de 3-5 minutos con 1 mL de PBS 1X. Se agregaron 400  $\mu$ L de glicina 1% m/v en PBS 1X y después 400  $\mu$ L de tritón x-100 0,2% v/v en PBS 1X, cada uno incubado durante 5 minutos y seguido de 3

lavados con PBS 1x. Luego, se agregaron 400  $\mu$ L de BSA 1% m/v en PBS 1X y se incubaron en agitación por 1 hora. Pasado el tiempo, los vidrios fueron colocados sobre una gota de 30  $\mu$ L del anticuerpo primario montada sobre un parafilm, asegurando que la cara que tiene las células adheridas sea la que esté en contacto con el anticuerpo; y se incubó en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Los vidrios fueron devueltos a la placa P12 y se realizaron tres lavados de 3-5 minutos con 1 mL de PBS 1X. Luego de los lavados, los vidrios fueron colocados sobre una gota, montada sobre parafilm, de 30  $\mu$ L del anticuerpo secundario y se incubó en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Nuevamente los vidrios fueron devueltos a la placa P12 y se realizaron tres lavados de 3-5 minutos con 1 mL de PBS 1X. Para teñir los núcleos, todos los vidrios se incubaron por 5 minutos sobre gotas de 30  $\mu$ L de Hoechst (Invitrogen, H3570) en PBS 1X y al resguardo de la luz. Una vez finalizado el tiempo, se realizaron tres lavados de 3-5 minutos con 1 mL de PBS 1X. Para finalizar, los vidrios cubreobjetos se montaron sobre gotas de 8  $\mu$ L de Mowiol 4-88 (Sigma, 81381) en vidrios portaobjetos limpios. Pasados 15 minutos, se sellaron los bordes con esmalte y se guardaron en heladera, resguardados de la luz, hasta el momento de verlos en el microscopio confocal.

Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal Zeiss LSM980, utilizando un objetivo de aumento 63X (NA=1.42) inmerso en aceite. El servicio fue brindado por el Centro de Microscopía de Fluorescencia “Gregorio Weber”, ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo supervisión de la Dra. Victoria Repetto. Las imágenes obtenidas fueron visualizadas utilizando el software *ImageJ 2.9.0*.

Se analizaron mínimo 10 campos por vidrio con alrededor de 25 núcleos cada uno. Se realizaron máscaras binarias a partir de la imagen de HOECHST para determinar los núcleos y medir la intensidad de fluorescencia de los distintos canales (<https://www.youtube.com/watch?v=9-gsw17zQd8>). Se realizó un promedio de los valores de intensidad de fluorescencia del canal de interés y se comparó distintos tratamientos o distintas poblaciones celulares. Posteriormente, para una fácil visualización de los resultados, se graficó las veces de cambio del promedio de fluorescencia respecto al valor promedio obtenido con el vehículo o con la población celular control.

Como control de la técnica, se usó un vidrio teñido con Hoechst sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- anticuerpo monoclonal anti-RUNX1 hecho en conejo (CST 4334) en una dilución 1/50 en BSA 1% m/v en PBS 1X.

- anticuerpo monoclonal anti-ABCG2 hecho en ratón (sc-377176) en una dilución 1/50 en BSA 1% m/v en PBS 1X.
- anticuerpo monoclonal anti-PGP hecho en ratón (sc-55510) en una dilución 1/50 en BSA 1% m/v en PBS 1X.
- anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21206) con una dilución 1/1000 en BSA 1% m/v en PBS 1X.
- anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202) con una dilución 1/1000 en BSA 1% m/v en PBS 1X.
- anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen, A21203) con una dilución 1/1000 en BSA 1% m/v en PBS 1X.

## **XV. Buffers y soluciones**

**PBS 1X:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH = 7,4

**Cracking buffer 2X:** 0,02% m/v Azul de bromofenol, 40% v/v SDS 10%, 20% v/v Glicerol y 50 mM Tris pH = 6,8. Añadir 10% v/v β-mercptoetanol.

**Tris-Glicina 10X:** 114,2 g Glicina y 30,3 g Tris. Llevar a 1 L con Agua destilada.

**Buffer de corrida 1X:** 100 mL Tris-Glicina 10X, 10 mL SDS 10% y 890 mL Agua destilada.

**Buffer de transferencia 1X:** 100 mL Tris-Glicina 10X, 200 mL Metanol, 700 mL de Agua destilada.

**Solución de Rojo Ponceau:** 0,2% m/v Rojo Ponceau y 0,5% v/v Ácido acético glacial.

**TBS 10X:** 500 mL NaCl 3 M y 500 mL Tris-HCl 0,5 M pH=7,5.

**TBS-T 1X:** 100 mL TBS 10X, 900 mL Agua destilada y 0,05% Tween 20.

**Solución de bloqueo:** TBS-T 1X y 5% m/v Leche descremada en polvo (Svelty).

**Gel concentrador:** 5% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 130 mM Tris-HCl pH = 6,8; 0,1% v/v SDS 10%; 0,1% v/v Persulfato de amonio (APS) 10% y 0,04% v/v TEMED.

**Gel separador:** 9,9% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 375 mM Tris-HCl pH = 8,8; 0,1% v/v SDS 10%; 0,1% v/v Persulfato de amonio (APS) 10% y 0,1% v/v TEMED.

**Mowiol:** 2,4 g Mowiol; 6 g Glicerol; 6 mL Agua destilada; 12 mL 0,2 M Tris pH = 8,5

**TAE 1X:** 0,8 mM Tris, 0,02 mM EDTA y 0,11% v/v Ácido acético glacial pH=8.4.

**LB:** 10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl. Ajustar pH A 7,4. Llevar a 1 litro con agua destilada.

**LB-AGAR:** Misma receta que LB + 15 g de agar.

**Metilcelulosa 1,2%:** 6 g metilcelulosa en 500 ml medio base (mitad precalentado a 60ºC y la otra mitad a temperatura ambiente). Mezclar la solución por 2 horas a 4ºC. Aliquutar en falcons de 50 ml y centrifugar a 5000 xg por 2 horas a temperatura ambiente. Utilizar sobrenadante. Protocolo adaptado de O Leis *et al*, 2012.

**Binding Buffer 10x:** NaCl 1,4M, Hepes 0,1M (pH 7,4), CaCl2 25mM.

**Formalina 10%:** 27 ml de formalina 37% en un volumen final de 100 ml llevando a volumen con agua destilada.

**Cristal violeta 0,5%:** 0,5 g de cristal violeta en un volumen final de 100 ml con metanol 25% (25 ml de metanol en 100 ml de agua destilada).

**Ácido acético 5%:** 5 ml de ácido acético en un volumen de final de 100 ml con agua destilada.

**Glicina 1%:** 1 g de glicina en un volumen final de 100 ml de PBS 1x.

**Tritón x-100 0,2%:** 200 ul de Tritón en un volumen final de 100 ml de PBS 1X.

**BSA: 1%:** 1 g de BSA en un volumen final de 100 ml de PBS 1X.

## **XVI. Análisis estadístico**

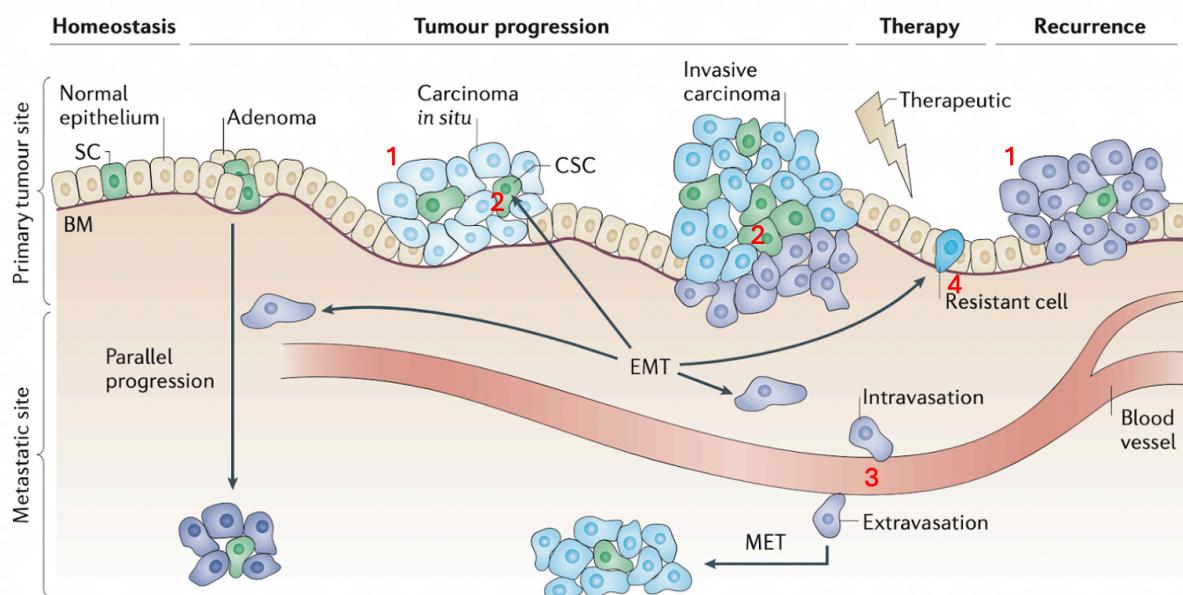
La visualización y análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 10. La significancia estadística se evaluó usando distintas pruebas y contrastes según el caso, los cuales son aclarados en cada figura. Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces antes de analizar la significancia estadística. Un *p*-valor igual o inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

# RESULTADOS

Antes de adentrarnos en los resultados de cada objetivo, queremos mencionar que los experimentos de esta tesis fueron realizados utilizando cuatro modelos celulares que representan parte de la **heterogeneidad intratumoral** descrita en la introducción. Estos modelos reflejan los distintos tipos celulares que componen la masa tumoral que potencialmente promueven la resistencia a la terapia y nos interesa estudiar de forma individual en este trabajo:

- 1) células creciendo en condiciones estándar adheridas a la placa;
- 2) células creciendo en suspensión forzada,
- 3) células formando mamósferas; y
- 4) células resistentes a paclitaxel.

Estos modelos celulares pueden verse ejemplificados en la **Figura 15**.



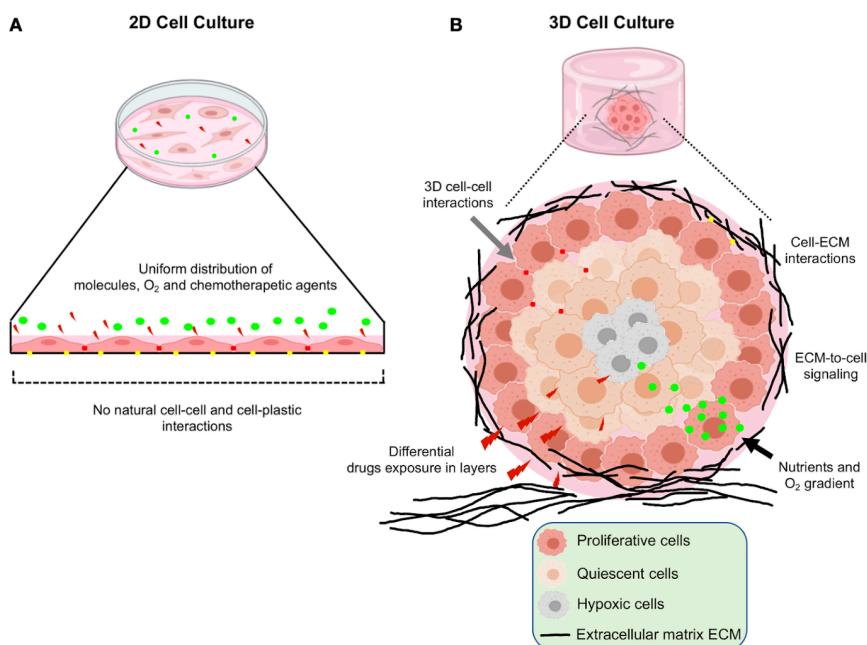
**Figura 15.** En esta figura se observan las cuatro subpoblaciones celulares que estudiamos a lo largo de la tesis: las alojadas dentro del carcinoma *in situ* o de la metástasis ya establecida (1), las CSCs que se encuentran dentro del carcinoma (*in situ* e invasivo) (2), las circulatorias que viajan por el torrente sanguíneo (3), y las resistentes a la terapia (4) (Figura modificada de Bram de Craene and Geert Berx, 2013).

Las células adheridas representan aquellas pertenecientes a un tumor metastásico, dado que las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron generadas a partir de una metástasis (ver **Materiales y Métodos – líneas celulares**). Las células cultivadas en suspensión forzada modelan **células tumorales circulantes (CTCs)**, las cuales circulan a través del torrente sanguíneo y presentan un fenotipo ***stem-like*** característico. Las **mamósferas**, en cambio,

representan las **células madre cancerosas (CSCs)** del tumor, ya que únicamente estas (y no el resto de las células tumorales) poseen la capacidad de crecer formando estas estructuras esféricas a partir de una sola célula. Finalmente, las células resistentes a **paclitaxel** modelan la subpoblación tumoral que sobrevive al tratamiento con este fármaco quimioterapéutico.

De este modo, es posible responder nuestras preguntas de investigación evaluando de manera individual la respuesta de cada subpoblación celular, considerando la potencial heterogeneidad intratumoral (ver **Figuras 2 y 15**).

Los modelos celulares de crecimiento en 3D (el modelo de mamósferas y el modelo de células crecidas en suspensión forzada) permiten que las células crezcan e interactúen entre sí a lo largo, a lo ancho y a lo alto formando estructuras esféricas (o agregados, según el caso) en suspensión que limitan la difusión de oxígeno y nutrientes generando un microambiente hipóxico con células necróticas en el interior y células proliferativas en el exterior, lo cual recrea de manera más fisiológica las características biológicas y moleculares del tumor, pudiendo obtener, por ejemplo, una evaluación más “real o cercana” a la observada con el tratamiento en el paciente (Salinas-Vera et al, 2022).



**Figura 16.** Representación esquemática de las diferencias principales entre cultivos celulares 2D y 3D. **a-** Cultivo celular 2D donde las células crecen en una monocapa sobre el fondo de la placa plástica. Las interacciones célula-célula reducidas; la exposición ilimitada a nutrientes, oxígeno y drogas son limitaciones de este tipo de cultivos. **b-** Cultivo celular 3D, en donde las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular aumentadas; el acceso limitado a

nutrientes y oxígeno y la heterogeneidad a interacciones con las drogas conduce a una mejor recapitulación del microambiente tumoral que ocurre *in vivo*. (Salinas-Vera et al, 2022). Cabe destacar que en esta figura, el modelo 3D tiene una matriz extracelular que en nuestros modelos no está presente.

Sin embargo, es importante resaltar que una limitación de esta estrategia es que evaluamos a cada subpoblación por separado, cuando en el tumor completo hay conexión entre subpoblaciones y con el microambiente tumoral. En esta tesis buscamos estudiar fenómenos tumorales (descritos a continuación) en cada subpoblación tratando de aproximarnos a lo que la heterogeneidad le significa al tumor, con su consecuente dificultad para responder a la terapia recibida, sin perder de vista esta limitación.

Otra aclaración pertinente es que esta tesis doctoral estaba inicialmente enfocada en RUNX1 ya que ciertas publicaciones demostraron que era la proteína de la familia RUNX con mayor representatividad en el epitelio mamario tanto humano como murino (Wang ET et al., 2008; Janes KA., 2011; Wang L et al., 2011; Blyth K et al., 2010; Kendrick et al. 2008; McDonald et al. 2014; van Bragt et al. 2014, Fernández et al 2023). Sin embargo, en el último tiempo se han reportado algunos trabajos en donde se determina que RUNX2 también tiene un rol en cáncer de mama (Fritz AJ et al., 2020; Si W. et al., 2020; Thomas W. Owens et al., 2014; Fengxu Lv et al., 2024; Yin X. et al., 2022). Hay ciertos experimentos en donde medimos la expresión de RUNX2 y los mostramos en esta tesis y otros en donde aún estamos completando mediciones para el envío del manuscrito. Dado que en la mayoría de los experimentos utilizamos el inhibidor comercial AI-10-104, la actividad transcripcional de todos los miembros de la familia RUNX está inhibida. RUNX3, por su parte, sí que se encuentra apenas detectable, razón por la cual no fue tenido en cuenta en esta tesis (Kendrick et al. 2008; McDonald et al. 2014; van Bragt et al. 2014). Por lo tanto cuando mencionamos RUNX nos estamos refiriendo tanto a RUNX1 y RUNX2, salvo que se especifique.

## **Objetivo 1:**

### **Evaluar la relevancia de la actividad transcripcional de RUNX1 y RUNX2 en procesos tumorales.**

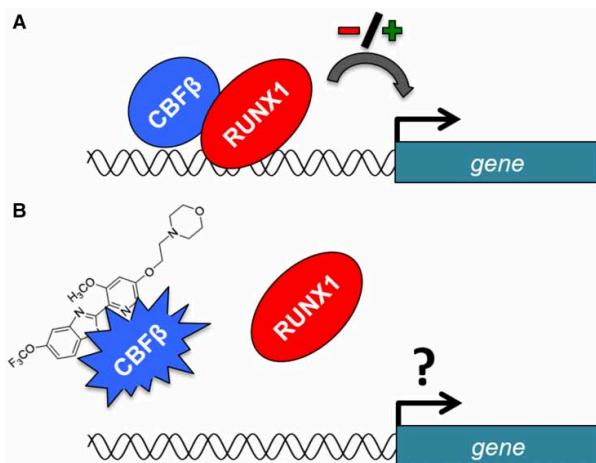
Para estudiar la participación de RUNX 1 y 2 en el proceso de resistencia a quimioterapia, en primer lugar investigamos de qué manera afecta la pérdida de función de estos factores de transcripción a las células tumorales. Para ello evaluaremos distintas características celulares que promueven la agresividad tumoral usando los cuatro modelos celulares mencionados previamente y utilizando el inhibidor de la actividad transcripcional de RUNX comercial, AI-10-104, descrito a continuación:

#### ***Inhibidor comercial AI-10-104***

En la Introducción se mencionó la participación del complejo RUNX/CBF $\beta$  como regulador de la transcripción génica en distintos procesos del desarrollo embrionario y como intermediario en procesos tumorales. Dada la importancia de estas proteínas tanto en el desarrollo normal como en una variedad de cánceres, las pequeñas moléculas capaces de modular su actividad son potencialmente útiles para evaluar nuevos enfoques terapéuticos (Illendula *et al.*, 2016; Fernández *et al* 2023).

El compuesto sintético AI-10-104 (**Figura 10**) se une al cofactor CBF $\beta$  generando un cambio conformacional que altera su afinidad inhibiendo la interacción con RUNX de manera alostérica. El complejo no puede translocarse al núcleo, de modo que se pierde la regulación transcripcional mediada por RUNX/CBF $\beta$  (Illendula *et al.*, 2016). Se ha determinado que estos inhibidores reducen significativamente el crecimiento y la supervivencia de diversas líneas celulares de leucemia mieloide y eliminan por completo la formación de colonias en una línea celular de cáncer de mama de tipo basal (Illendula *et al.*, 2016).

Este inhibidor es utilizado en nuestro laboratorio y funciona en líneas celulares humanas TNBC (Fernández *et al.*, 2023; Couto FL., “Estudio de la regulación de KLF4 por RUNX1 en un modelo experimental de células madre de cáncer de mama triple negativo”).



**Figura 17.** **a-** El complejo RUNX/CBF puede actuar como represor o activador de la transcripción de manera dependiente del contexto. **b-** Se han desarrollado pequeñas moléculas como inhibidores sintéticos que bloquean la interacción entre RUNX y CBF $\beta$ , lo que conduce a una disminución en la unión de RUNX al ADN y a una expresión génica aberrante (Figura extraída de Elitza Deltcheva and Rachael Nimmo, 2017).

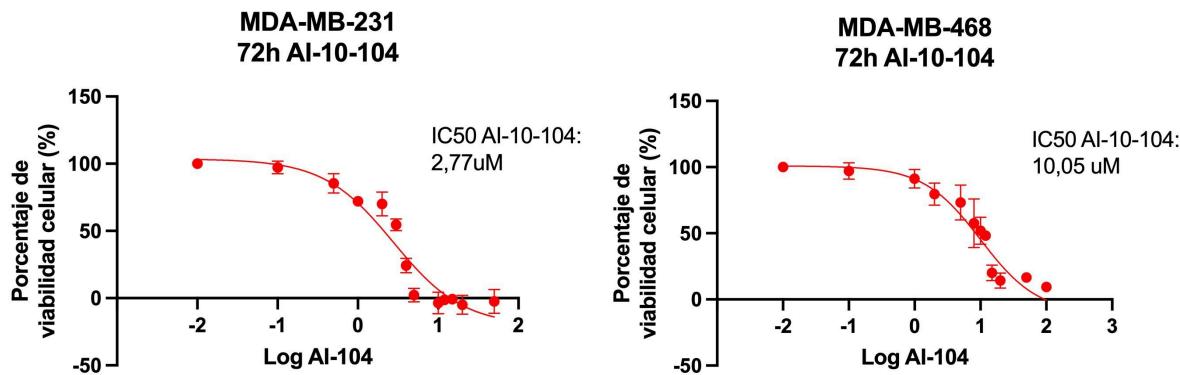
### 1.1: Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en la viabilidad celular:

#### Análisis de viabilidad celular

Las líneas celulares seleccionadas (MDA-MB-231/468) provienen de metástasis pleural de cáncer de mama humano y son altamente proliferativas, característica distintiva del cáncer (Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2011). Por esta razón nos interesó estudiar si la reducción de la actividad transcripcional de *RUNX1* altera la supervivencia celular realizando un ensayo de viabilidad celular.

#### *Elección de la dosis de trabajo del inhibidor AI-10-104*

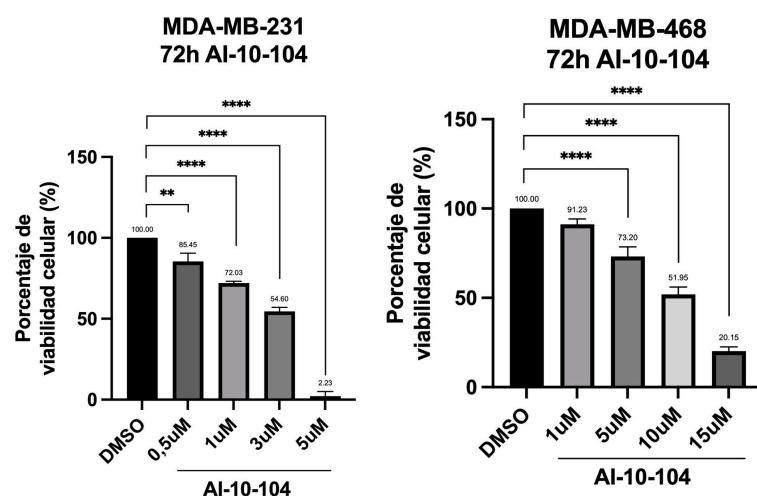
Para desarrollar este primer objetivo, utilizamos un inhibidor comercial de la actividad transcripcional del factor de transcripción RUNX1: AI-10-104. Inicialmente calculamos el valor de IC<sub>50</sub> de esta droga para las líneas celulares de TNBC humano mayormente utilizadas a lo largo de la tesis: MDA-MB-231 y MDA-MB-468, con el fin de identificar las dosis a utilizar para los distintos experimentos. Cabe destacar que en ambas líneas celulares se demostró una alta expresión de *RUNX1* (Ferrari N. et al., 2014; Recouvreux et al 2016). Como muestra la **Figura 18**, las células fueron tratadas durante 72 horas con distintas dosis de AI-10-104, luego de lo cual realizamos un ensayo de cristal violeta, que tiñe las proteínas de las células remanentes, obteniendo un valor de absorbancia que representa las células que sobrevivieron al tratamiento. A partir de estos datos se calculó el valor de IC<sub>50</sub> para cada línea.



**Figura 18.** Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de concentraciones crecientes del inhibidor para las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468. El valor de IC50 es obtenido a partir de una transformación logarítmica de las concentraciones de AI-10-104 y una regresión no lineal realizada en el programa *GraphPad*. Se considera 100% de viabilidad al tratamiento con vehículo (DMSO).

Considerando los valores de IC50 3 uM para MDA-MB-231 y 10 uM para MDA-MB-468, procedimos a realizar los siguientes experimentos. Cabe destacar que estos valores fueron controlados a lo largo de los años en función del número de pasajes celulares o si se utilizó la misma línea celular pero proveniente de un laboratorio distinto. En cada caso experimental siempre se utilizaron valores menores al IC50 calculado para trabajar en una ventana de oportunidades que permita medir procesos biológicos previos a la inducción de apoptosis.

Con los datos obtenidos en el experimento anterior (utilizados para calcular el valor de IC50 de AI-10-104), se realizó un gráfico de barras sólo con algunas dosis de inhibidor que nos permita analizar estadísticamente que el tratamiento con el inhibidor AI-10-104 disminuye la viabilidad celular de estas líneas TNBC. Es decir que la presencia de RUNX es necesaria para mantener a las células viables.

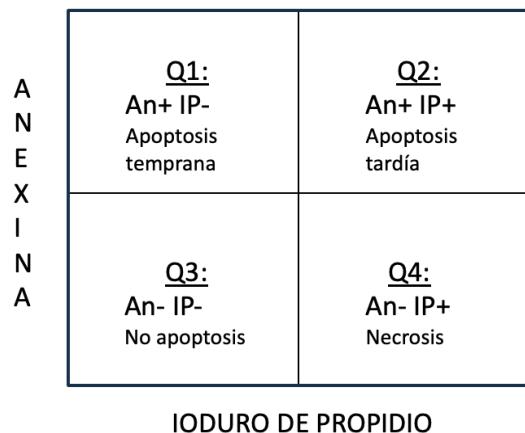


**Figura 19.** Porcentaje de células viables en función de la concentración del inhibidor AI-10-104 en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 tras 72 horas de tratamiento. Los valores son relativos al tratamiento con DMSO durante 72 horas. Se graficó la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ) en ambos casos. Se considera 100% de viabilidad al tratamiento con vehículo (DMSO). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis

de AI-10-104. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 1.2: Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en inducción de la muerte celular programada (apoptosis):

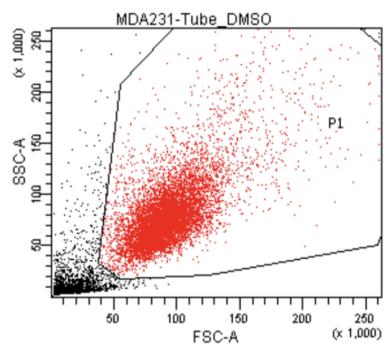
Dado que, como se observa en la **Figura 19**, la viabilidad celular se reduce con la pérdida de función de RUNX y que, resistir o evadir la inducción de muerte celular es una de las capacidades biológicas adquiridas por las células tumorales durante su malignización y progresión (Hanahan and Weinberg, 2011), decidimos evaluar la apoptosis. Al igual que en el experimento de viabilidad, se trató a las MDA-MB-231/468 con AI-10-104 durante 72 horas utilizando dosis de AI-10-104 cercanas al IC50 calculado previamente. Se levantaron las células junto con su medio de cultivo (para evaluar las células ya muertas y en suspensión) y se marcaron con Anexina V Cy5 (An) y con Ioduro de propidio (IP) según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. La **Figura 20** muestra los gráficos obtenidos a partir de la medición y el análisis en el citómetro de flujo: la columna izquierda (**a**) muestra la población celular, denominada “*gate*” en citometría (puntos rojos), elegida para analizar. Esta población contenida en el *gate* abarca la totalidad de las células excepto el *debris* o células rotas (puntos negros); y la columna derecha (**b**) muestra las cuatro subpoblaciones celulares obtenidas: An<sup>-</sup>IP<sup>-</sup> (células vivas - Q3), An<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> (apoptosis temprana - Q1), An<sup>+</sup>IP<sup>+</sup> (apoptosis tardía - Q2) y las An<sup>-</sup>IP<sup>+</sup> (necrosis - Q4). La ubicación de cada subpoblación en el gráfico es la siguiente:



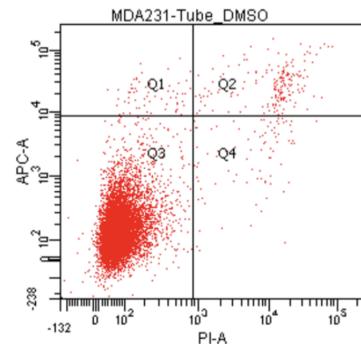
### A- MDA-MB-231

a-

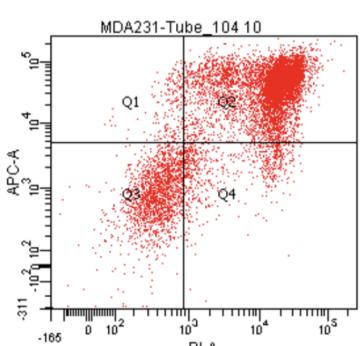
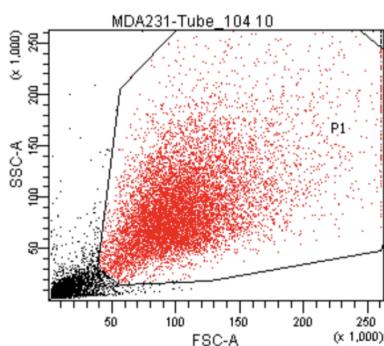
### DMSO



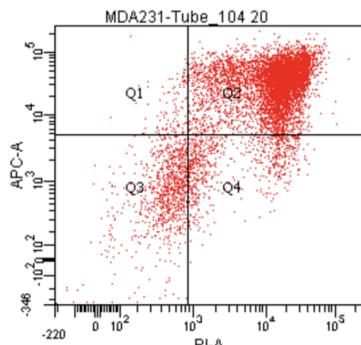
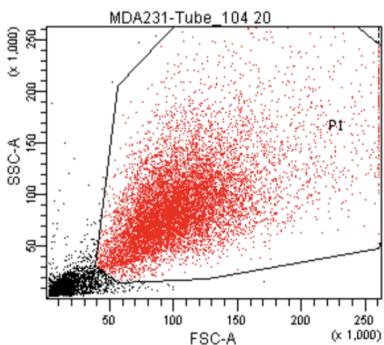
b-



### AI-10-104 10 uM



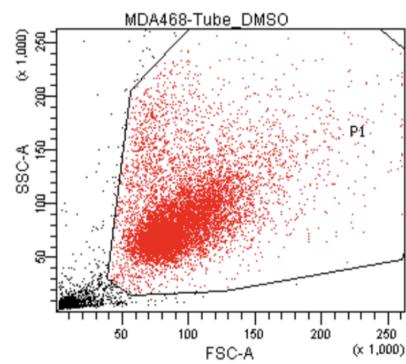
### AI-10-104 20 uM



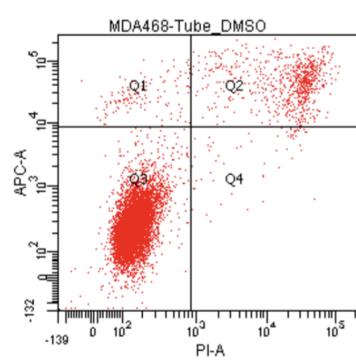
### B- MDA-MB-468

a-

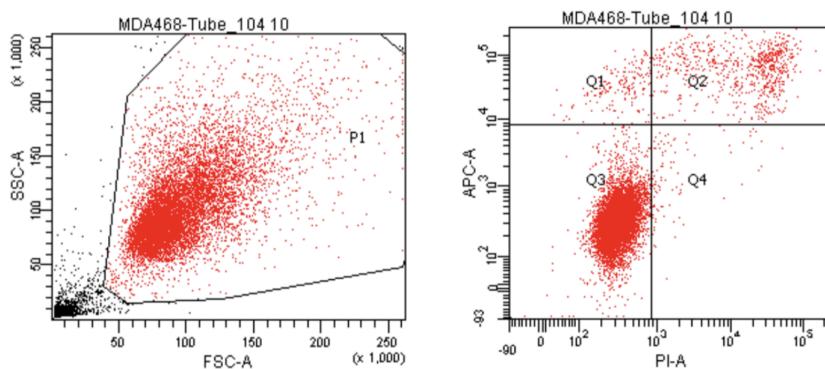
### DMSO



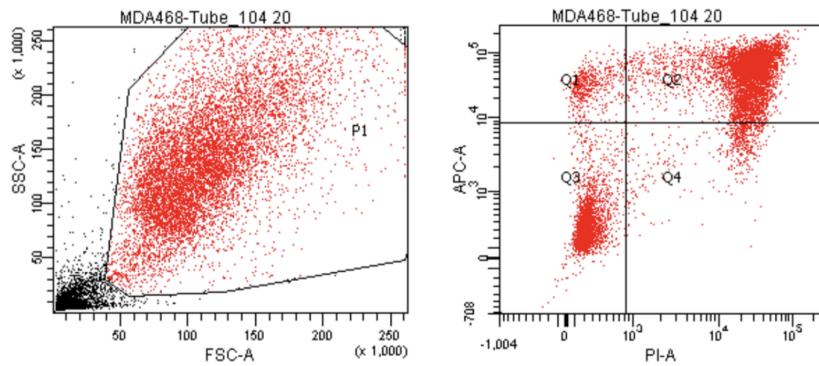
b-



### AI-10-104 10 uM



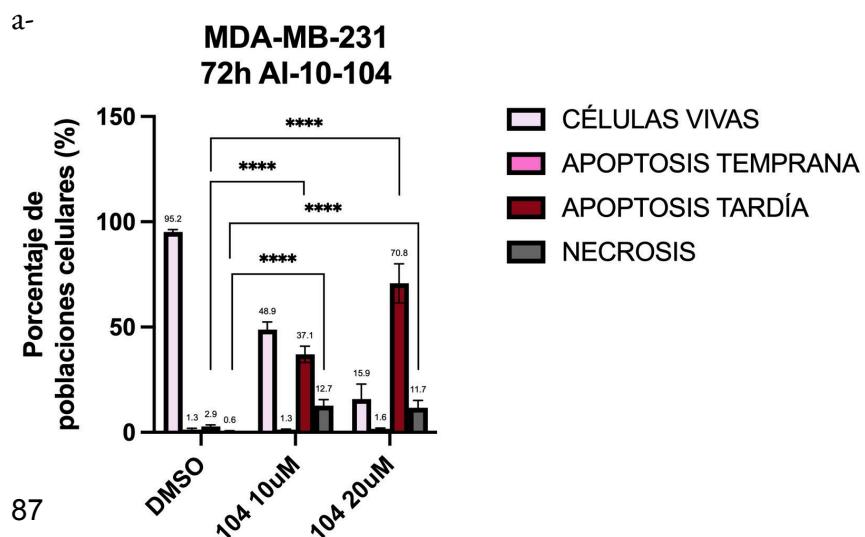
### AI-10-104 20 uM

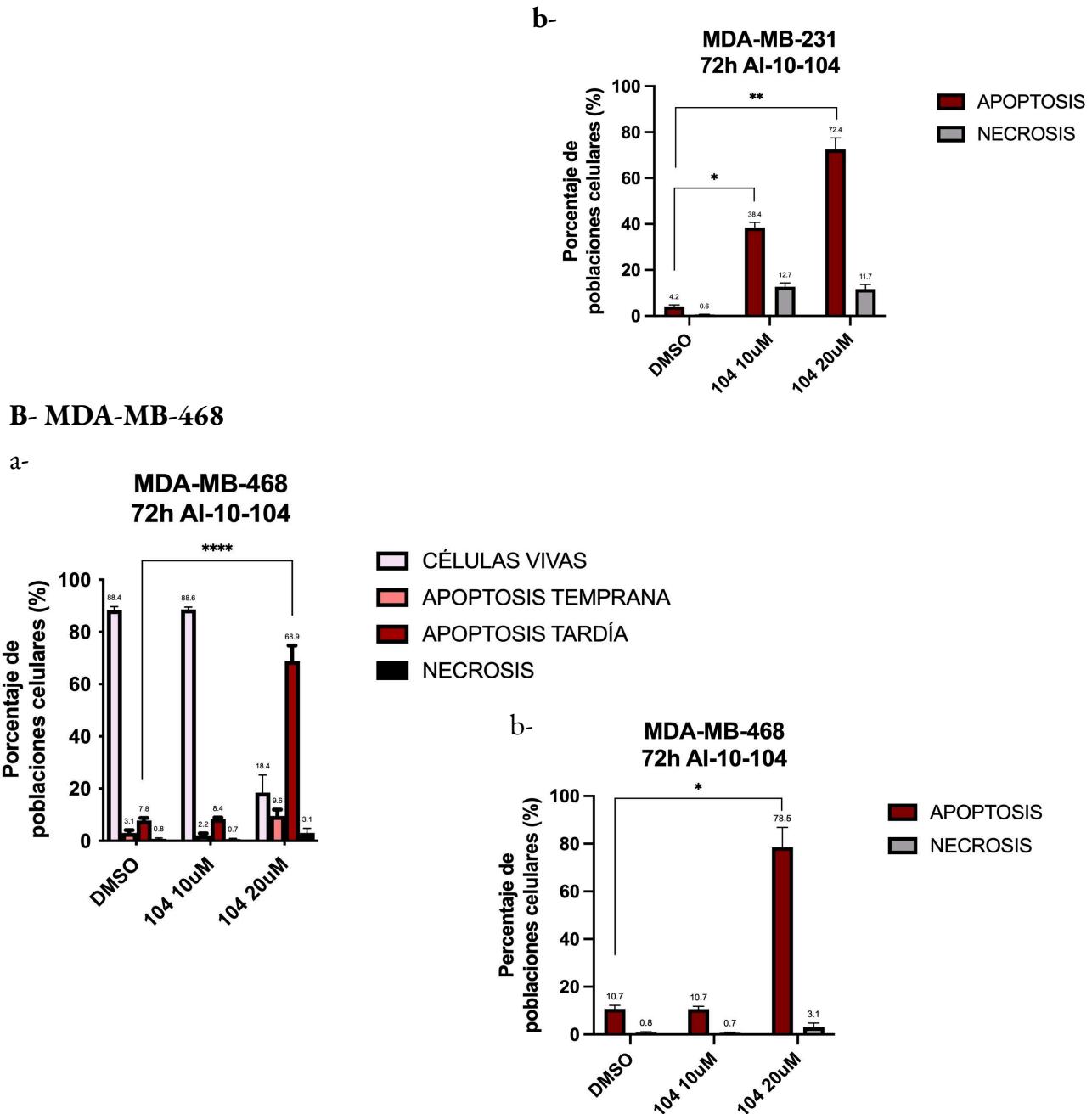


**Figura 20.** Dot plots representativos de **A**-MDA-MB-231 y **B**- MDA-MB-468 creciendo adheridas obtenidos utilizando el programa *FlowJo*. **a**- Dispersión lateral (SSC-A) en función de la dispersión frontal (FSC-A) de las células tratadas con el vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104) 10 o 20 uM durante 72h. La población de células que se eligió para analizar queda contenida en el gate P1. **b**- Medición de fluorescencia de Anexina V Cy5 (APC-A) en función de la fluorescencia de Ioduro de Propidio (PI-A) mostrando los cuatro cuadrantes correspondientes a las cuatro poblaciones celulares de las células tratadas con el vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104) 10 o 20 uM.

A partir del análisis de estos gráficos, el programa *FlowJo* calcula los porcentajes correspondientes a cada subpoblación celular, para cada tratamiento y en cada línea celular.

### A- MDA-MB-231





**Figura 21.** Porcentaje de subpoblaciones celulares apoptóticas o necróticas en **A- MDA-MB-231** y **B- MDA-MB-468** cultivadas en condiciones estándar (adheridas) tratadas s con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104) 10 y 20 uM durante 72 horas. **a-** Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y necróticas. **b-** Visualización simplificada del efecto del inhibidor, se ilustra el porcentaje de células apoptóticas (apoptosis temprana + apoptosis tardía) y necróticas cultivadas en condiciones estándar (adheridas). Se graficó la media ± ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis de AI-10-104. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

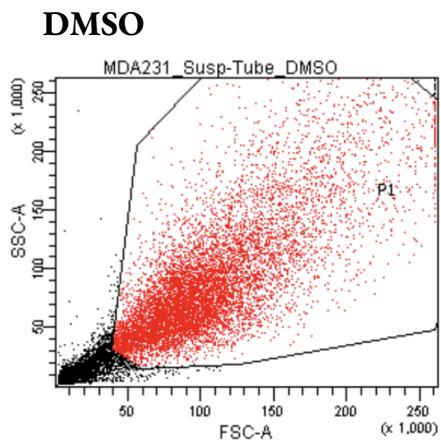
En la **Figura 21**, del lado izquierdo (**a**) se graficó el porcentaje de cada una de las cuatro subpoblaciones celulares; y del lado derecho (**b**), la apoptosis total (temprana+tardía) y la necrosis, con el fin de verlo de manera más simplificada. Como se puede observar, ambas

líneas celulares tratadas con AI-10-104 tienen niveles significativamente mayores de apoptosis que las células tratadas con vehículo, y en consecuencia el porcentaje de células vivas disminuye con el agregado del inhibidor. Este resultado nos indica que la pérdida de actividad funcional de RUNX promueve la muerte celular programada de manera significativa.

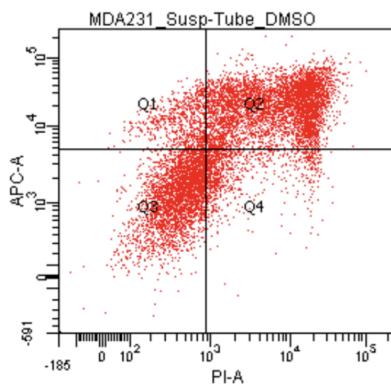
A continuación evaluamos si este fenómeno se producía también en el modelo de células en suspensión forzada; es decir, si inhibir la actividad transcripcional de *RUNX* también favorece la apoptosis en células circulantes de tumor. Para generar cultivos celulares en suspensión forzada, como explicamos en la sección de **Materiales y Métodos - Generación del modelo de células en suspensión forzada**, las células se plaquearon en placas pre-tratadas con poly-Hema evitando su adherencia al plástico, para así lograr su crecimiento en suspensión. Este modelo tiene como objetivo enriquecer el cultivo con células con fenotipo *stem* o pluripotente que simula, también, las células circulatorias tumorales como ya se ha reportado en otros estudios con otras líneas celulares (Fernández *et al.*, 2023 y Barton *et al.*, 2017). En este caso seguimos el mismo diseño experimental que con las células adheridas, pero sin la necesidad de la tripsinización para levantarlas. Las dejamos sin tratamiento un día, y al día posterior las tratamos. Después de 3 días con tratamiento (1+3), las levantamos y analizamos las cuatro subpoblaciones celulares: An<sup>-</sup>IP<sup>-</sup> (células vivas), An<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> (apoptosis temprana), An<sup>+</sup>IP<sup>+</sup> (apoptosis tardía) y las An<sup>+</sup>IP<sup>+</sup> (necrosis), mediante la técnica de citometría.

## A- MDA-MB-231

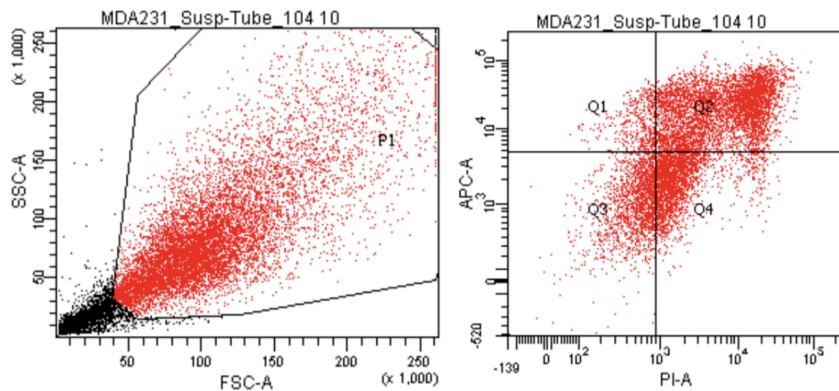
a-



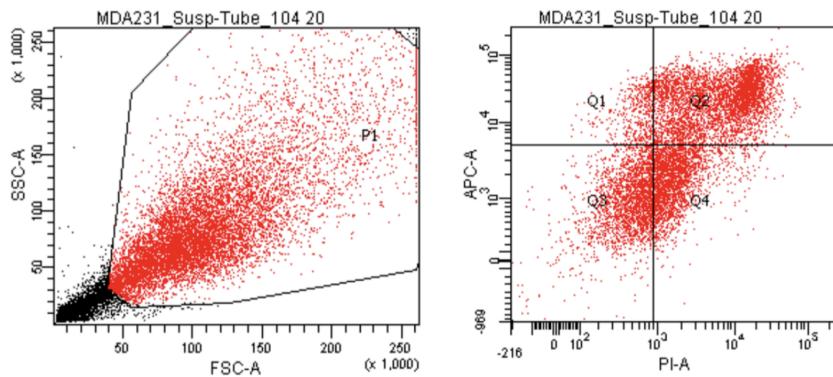
b-



### AI-10-104 10 uM



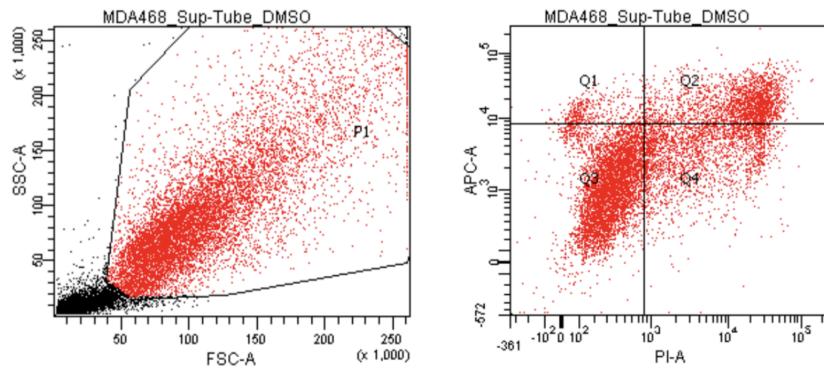
### AI-10-104 20 uM



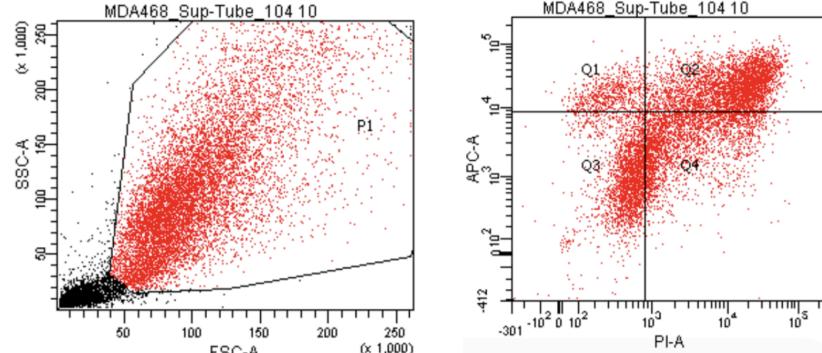
### B- MDA-MB-468

a-

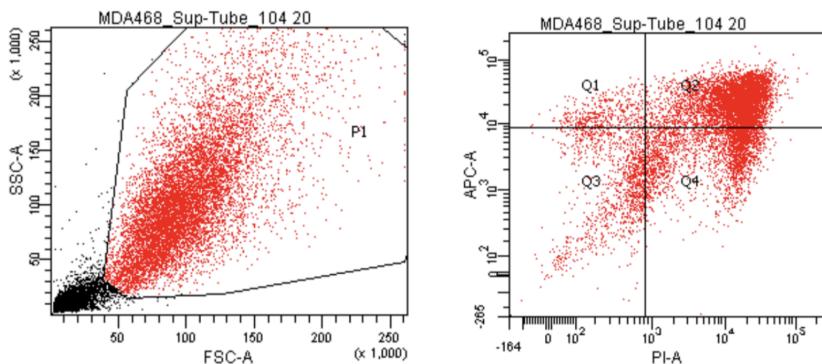
#### DMSO



### AI-10-104 10 uM



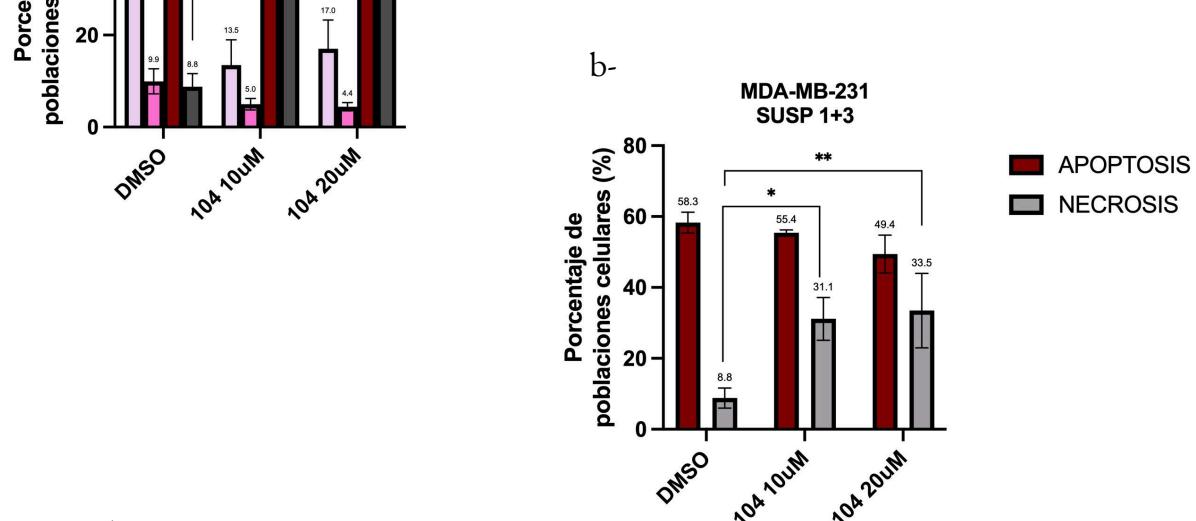
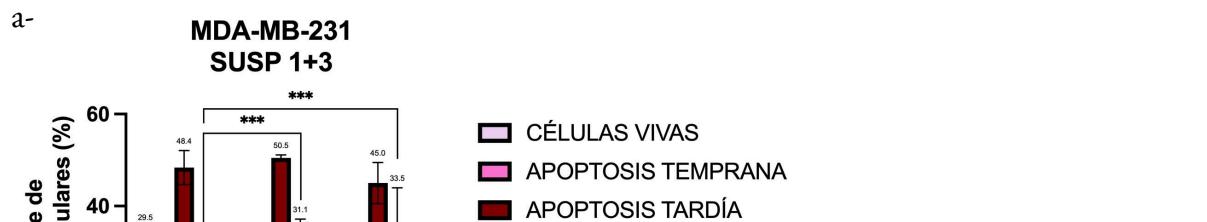
## AI-10-104 20 uM



**Figura 22.** Dot plots representativos de **A**-MDA-MB-231 y **B**- MDA-MB-468 creciendo en suspensión forzada obtenidos mediante el programa *FlowJo*. **a**- Dispersión lateral (SSC-A) en función de la dispersión frontal (FSC-A) de células tratadas con el vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104) 10 o 20 uM durante tres días. La población de células que se eligió para analizar queda contenida en el *gate* P1. **b**- Fluorescencia de Anexina V Cy5 (APC-A) en función de fluorescencia de Ioduro de Propidio (PI-A) mostrando los cuatro cuadrantes correspondientes a las cuatro subpoblaciones celulares de la muestra de células tratadas con el vehículo (DMSO) o con AI-10-104 10 o 20 uM en las condiciones previamente mencionadas (1+3).

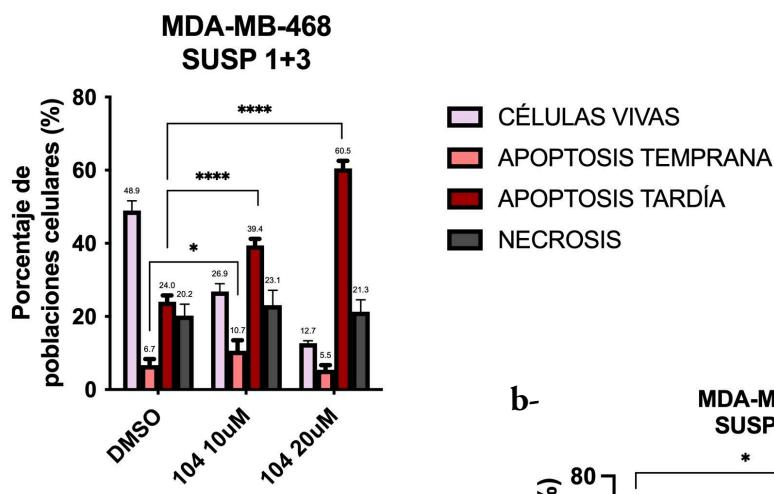
A partir del análisis de estos gráficos, el programa *FlowJo* calcula los porcentajes correspondientes a cada subpoblación celular, para cada tratamiento y en cada línea celular.

## A- MDA-MB-231

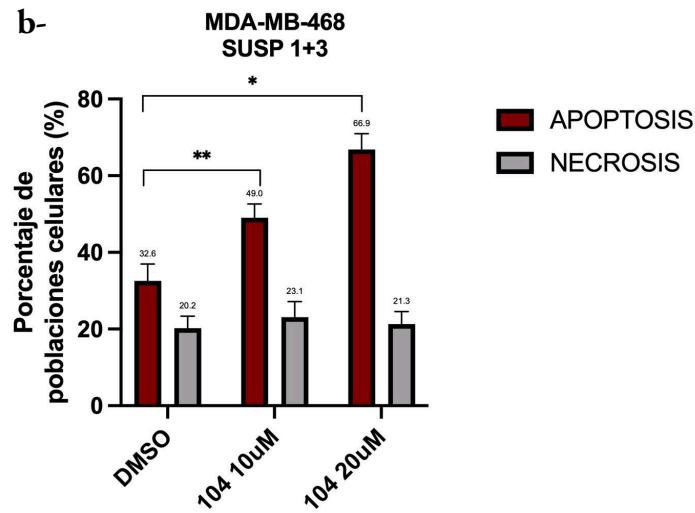


## B- MDA-MB-468

a-



b-



**Figura 23.** Porcentaje de subpoblaciones celulares apoptóticas y necróticas en **A**- MDA-MB-231 y **B**- MDA-MB-468 cultivadas en condiciones de suspensión forzada tras estar 1 día sin estímulo seguido de 3 días tratadas con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 10 y 20 uM. **a**- Porcentaje de células vivas no apoptóticas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas. **b**- Para una mejor visualización de los datos se ilustra el porcentaje de células apoptóticas (apoptosis temprana + apoptosis tardía) y necróticas cultivadas en condiciones en la condiciones previamente mencionadas (1+3). Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis de AI-10-104. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Como se observa en la **Figura 23**, el tratamiento con AI-10-104 aumenta los niveles de necrosis celular en las MDA-MB-231, pero no los de apoptosis que ya se encuentran elevados en las células control tratadas con DMSO. En el caso de las MDA-MB-468, al igual que en el modelo de adheridas, inhibir la actividad transcripcional de RUNX aumenta los niveles de apoptosis. Este resultado nos sugiere que RUNX es necesario, no solo para que las células sobrevivan (Sección 1.1), sino que la pérdida de su función induce la muerte celular programada en las MDA-MB-468 o la necrosis en el caso de las MDA-MB-231. A continuación se muestra un resumen de los porcentajes de apoptosis y necrosis en las líneas celulares TNBC estudiadas tratadas con AI-10-104:

MDA-MB-231	CÉLULAS ADHERIDAS		CÉLULAS SUSPENDIDAS	
	APOPTOSIS TOTAL	NECROSIS	APOPTOSIS TOTAL	NECROSIS
DMSO	4,2	0,6	58,3	8,8
AI-10-104 10 uM	38,4	12,7	55,4	31,1
AI-10-104 20 uM	72,4	11,7	49,4	32,5

**Tabla 2.** Porcentaje de apoptosis total (temprana+tardía) y necrosis en las MDA-MB-231 adheridas y suspendidas tratadas con distintas dosis de AI-10-104 y con su vehículo.

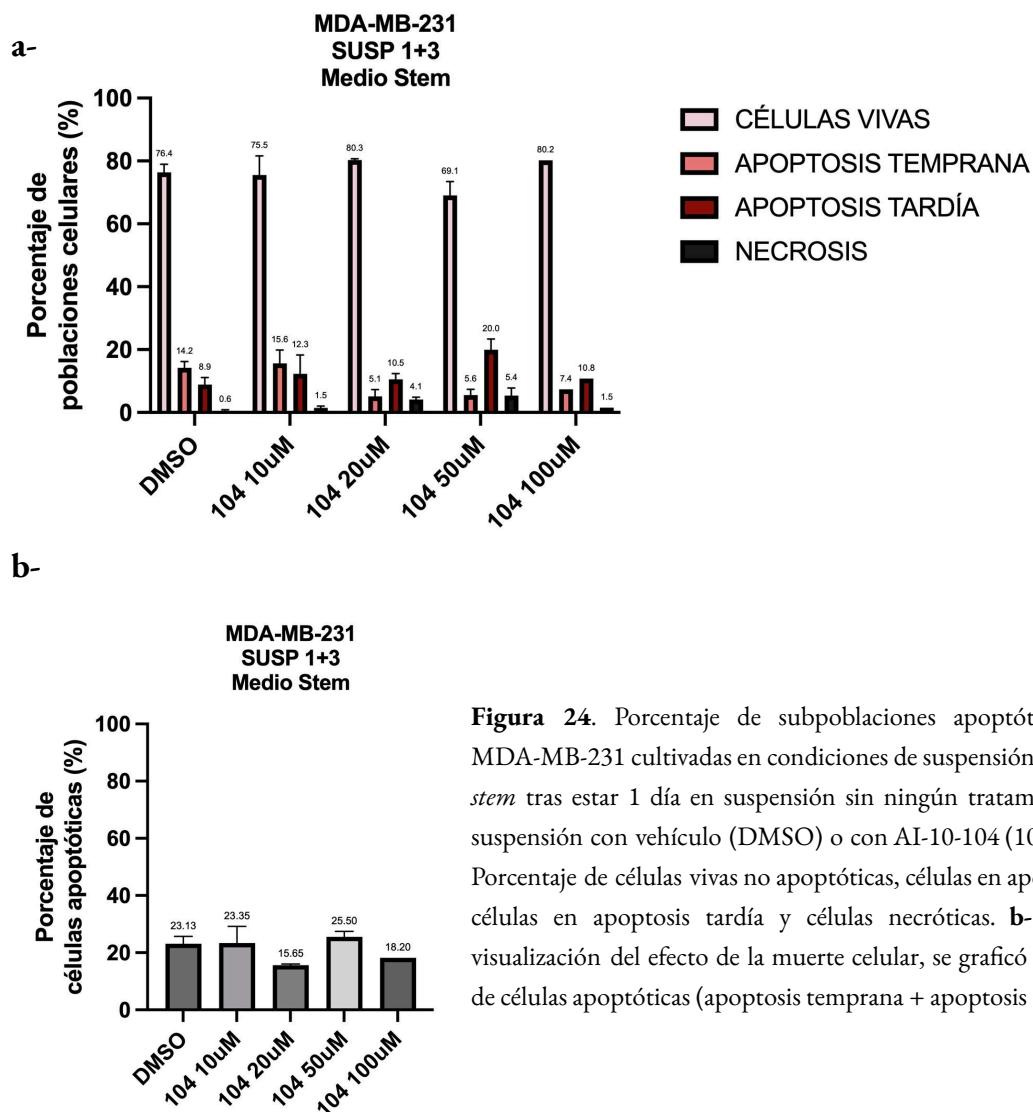
MDA-MB-468	CÉLULAS ADHERIDAS		CÉLULAS SUSPENDIDAS	
	APOPTOSIS TOTAL	NECROSIS	APOPTOSIS TOTAL	NECROSIS
DMSO	10,7	0,8	32,6	20,2
AI-10-104 10 uM	10,7	0,7	49	23,1
AI-10-104 20 uM	78,5	3,1	66,9	21,3

**Tabla 3.** Porcentaje de apoptosis total (temprana+tardía) y necrosis en las MDA-MB-468 adheridas y suspendidas tratadas con distintas dosis de AI-10-104 y con su vehículo.

Es importante destacar que el sólo hecho de exponer a las células a crecer en suspensión (en tratamiento con vehículo) disminuye el número de células vivas y aumenta la apoptosis y necrosis celular, tal como sucede cuando las células entran a circulación convirtiéndose en células tumorales circulantes, donde muchas sufren anoikis debido a la falta de adherencia celular (Huang, Q. et al., 2018). Esto ocurre particularmente en las células MDA-MB-231, observando una alta tasa de muerte de alrededor de 60% de apoptosis y 10% de necrosis, demostrando que estas células necesitan más factores solubles que los que les aporta el suero para sobrevivir en circulación.

Para favorecer la sobrevida de las células MDA-MB-231 creciendo en suspensión forzada, las cultivamos en un medio suplementado (B27, hEGF y hbFGF y L-glutamina= medio *stem*), que favorece el enriquecimiento de células *stem* (**Ver sección de Materiales y Métodos - Generación de Mamósferas**, es el medio utilizado para el crecimiento de éstas). En esta nueva estrategia los niveles de apoptosis de las células control (DMSO) son cercanos al 20%, es decir menores al cultivo sin medio *stem*. Sin embargo, a diferencia de las células

MDA-MB-468, el tratamiento con AI-10-104 no altera los niveles de apoptosis ni de necrosis en las células MDA-MB-231, incluso cuando se utilizan concentraciones del inhibidor mayores al IC<sub>50</sub> calculado en células adherentes (**Figura 24**).



**Figura 24.** Porcentaje de subpoblaciones apoptóticas celulares en MDA-MB-231 cultivadas en condiciones de suspensión forzada en medio *stem* tras estar 1 día en suspensión sin ningún tratamiento y 3 días en suspensión con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104) 10 y 20 uM. **a-** Porcentaje de células vivas no apoptóticas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas. **b-** Para una mejor visualización del efecto de la muerte celular, se graficó sólo el porcentaje de células apoptóticas (apoptosis temprana + apoptosis tardía).

Estos resultados sugieren que la línea celular MDA-MB-231 creciendo en suspensión forzada con medio *stem*, no requiere la actividad transcripcional de RUNX para sobrevivir dado que presenta una menor sensibilidad a la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en comparación con aquellas células que crecen en condiciones de adhesión.

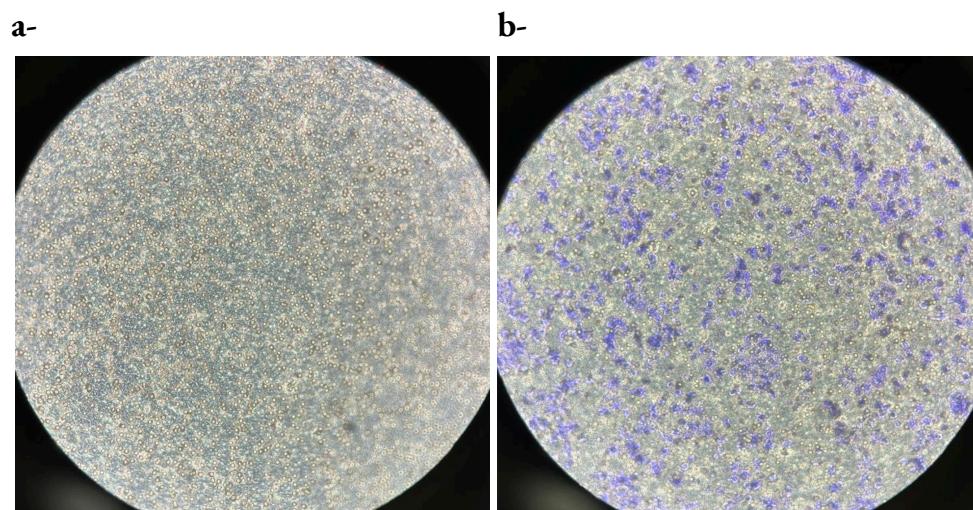
### 1.3: Efecto sobre la pérdida de función de RUNX en la migración celular

La metástasis requiere que las células tumorales adquieran capacidad migratoria, se diseminen e invadan otros tejidos. La capacidad de migrar es una de las características

necesarias para escindirse del tumor primario o metastásico, degradar la matriz del microambiente y trasvasar al torrente sanguíneo para dirigirse hacia otro tejido cercano o lejano. Para evaluar esta característica se utiliza un ensayo *in vitro* de migración a través de membranas porosas en insertos (Roarty K and Echeverría GV, 2021).

En una placa de 6 wells se plaquearon células de la línea MDA-MB-468 y se pre-trataron con DMSO (vehículo) o con AI-10-104 5 uM durante 72 horas (es necesaria una dosis menor al IC50 para no inducir niveles significativos de apoptosis, como se determinó en la **Figura 18**). Al cabo de ese tiempo, se levantaron y se plaquearon 50.000 células en insertos comerciales diseñados con una membrana con poros de 8 micrones por donde migrarán las células. Estos insertos se colocaron dentro de una placa de cultivo de 24 wells conteniendo medio DMEM F12 suplementado con 20% de SFB, que funciona como quimioatractante (QA). Las células dentro del inserto se incubaron durante 24 horas para dar lugar a la migración. Con un hisopo se limpió el lado de siembra del inserto eliminando las células no migrantes. De esta manera conservamos las células migrantes presentes del lado de abajo de la membrana del inserto que, finalmente, fueron fijadas y teñidas con cristal violeta para su posterior observación en el microscopio. Se cuantificaron las células teñidas (células migrantes) de todos los campos de la membrana con el programa *Fiji*.

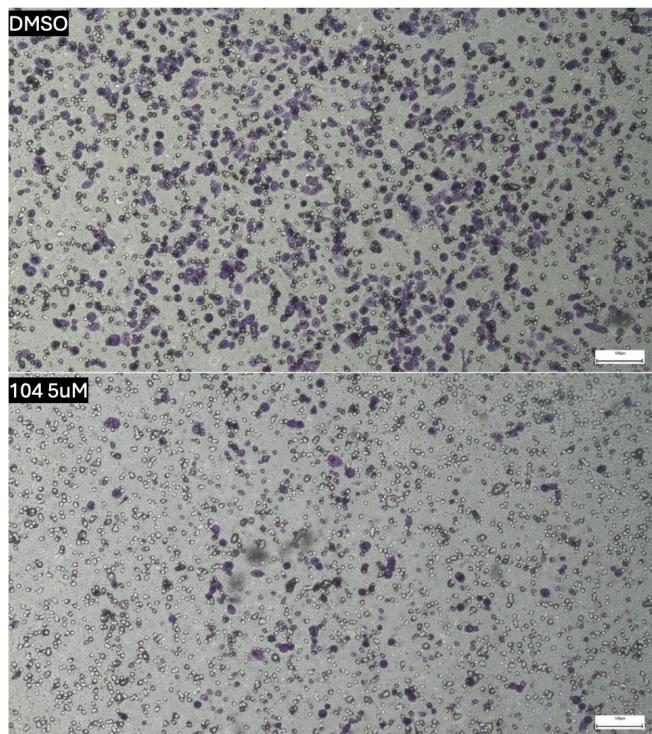
Como control negativo de la técnica, se utilizó medio DMEM F12 sin SFB (QA) y como control positivo, medio DMEM F12 con 20% SFB. Las células sin QA no migraron y las células con QA migraron en las proporciones esperadas (**Figura 25**).



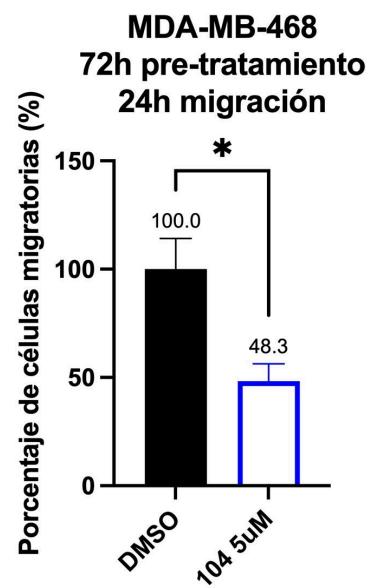
**Figura 25.** Imágenes representativas de **a-** MDA-MB-468 sin QA (izquierda) y **b-** MDA-MB-468 con 20% SFB como QA (derecha) tomadas con el celular en el microscopio Olympus CKX53 con aumento 4x (NA=0,10).

Como se puede ver en la **Figura 26**, la membrana perteneciente al tratamiento con AI-10-104 (barra azul vacía) presenta un número significativamente menor de células teñidas con cristal violeta comparado con las células tratadas con vehículo (DMSO) (barra negra llena).

a-



b-

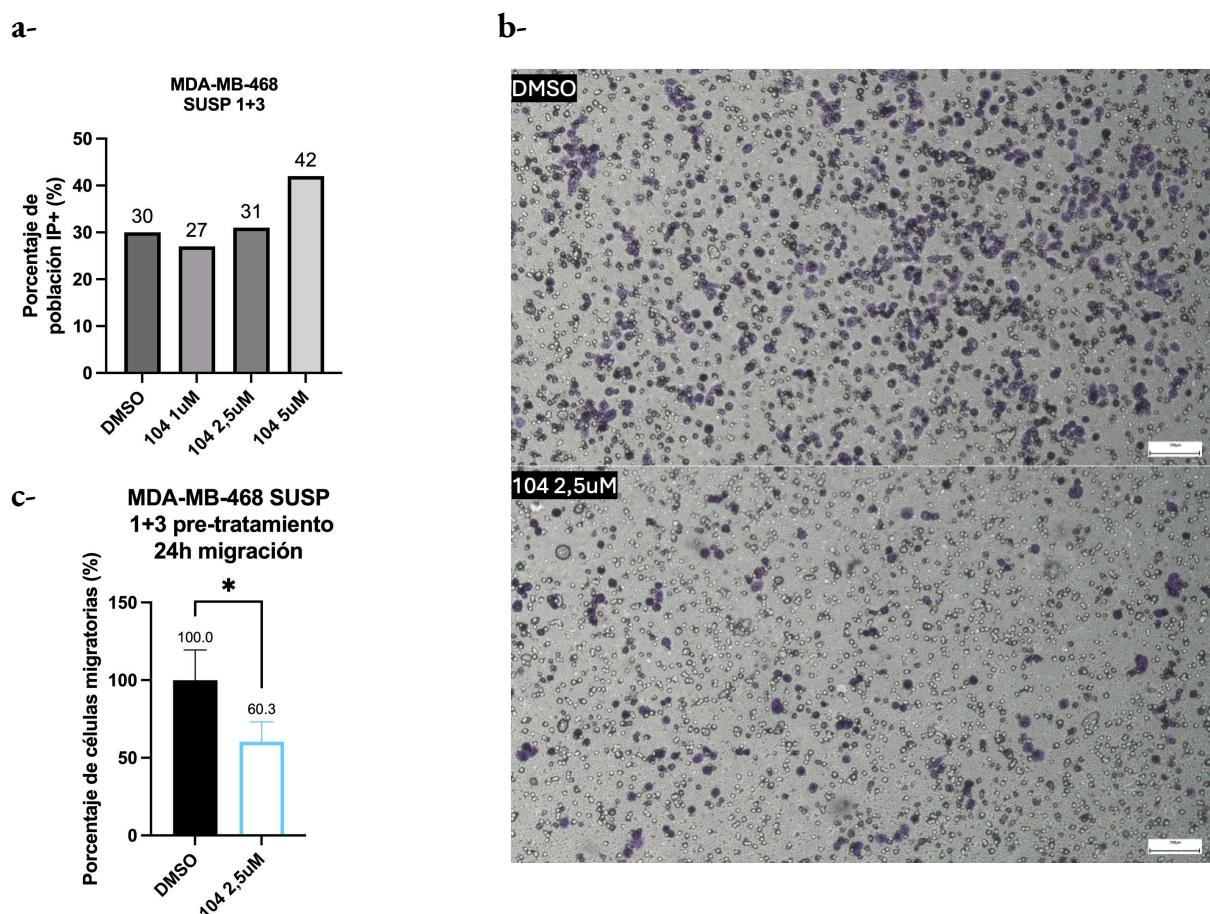


**Figura 26.** a- Imágenes de zonas representativas de las membranas con las células migrantes fijadas y teñidas con cristal violeta, tomadas con el microscopio Zeiss AX10 en el aumento 10X (NA=0.25) y analizadas con el programa *Fiji*. Células adheridas pre-tratadas con DMSO (arriba) o con AI-10-104 (104) 5 uM (abajo). b- Cuantificación de la migración como porcentaje de células migratorias pre-tratadas con vehículo o con AI-10-104 5 uM cultivadas en condiciones estándar de adherencia. Se considera 100% de migración a las células tratadas con vehículo (DMSO). Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ .

Por lo tanto, la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX reduce la capacidad migratoria de las células MDA-MB-468 cultivadas en condiciones estándar (adheridas). Estos resultados sugieren que RUNX es un factor necesario para el proceso de migración celular y reproduce el observado a través de la técnica de la herida en líneas murinas tumorales de mama reportadas por nuestro grupo previamente (Recouvreux et al 2016).

Esta estrategia experimental se repitió en células cultivadas en suspensión forzada. Para ello, las células MDA-MB-468 fueron sembradas en una placa pre-tratada con poly-HEMA evitando la adherencia celular a la misma. Las dejamos estabilizarse en suspensión sin

tratamiento un día, y al día posterior las tratamos. Después de 3 días con tratamiento (1+3), las levantamos. La concentración de AI-10-104 utilizada fue  $2,5 \mu\text{M}$ , con el objetivo de garantizar que el tratamiento no indujera muerte celular, como se puede observar en la **Figura 27a**, dado que, como se mencionó anteriormente, las células en suspensión forzada presentan un nivel basal de apoptosis más elevado que las células creciendo en condiciones estándar. Este experimento es el mismo que los de la sección 1.2 pero utilizando dosis menores de AI-10-104.



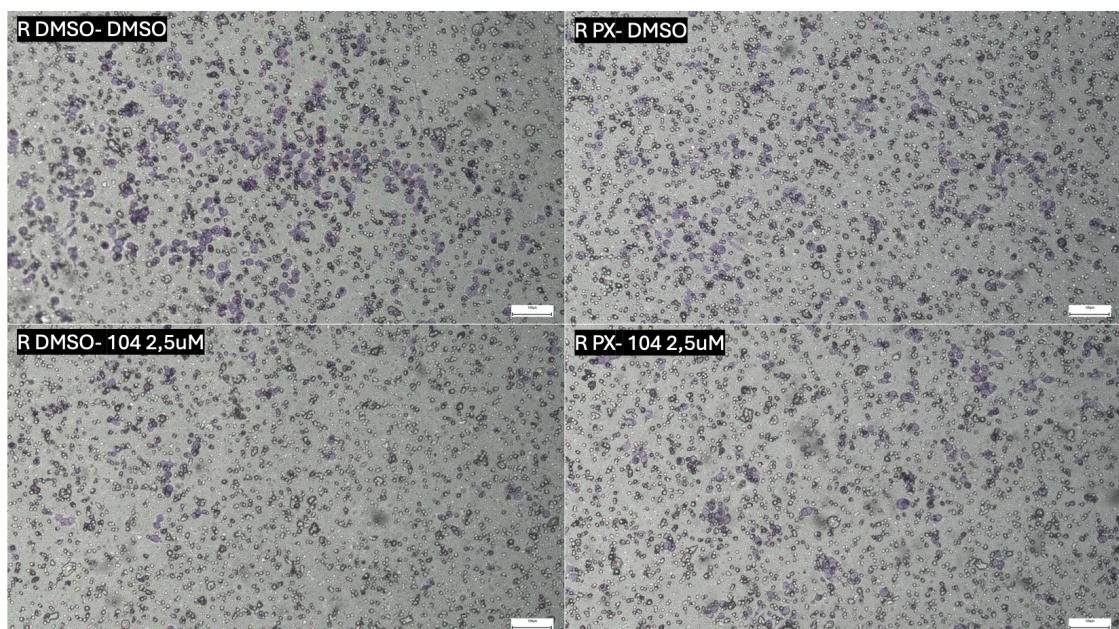
**Figura 27.** a- Porcentaje de células en suspensión positivas para Ioduro de Propidio (apoptóticas tardías y necróticas) tratadas con vehículo o con distintas dosis de AI-10-104 (104) para elegir la dosis correcta para esta técnica. b- Imágenes representativas de las membranas conteniendo las células migrantes teñidas con cristal violeta tomadas con el microscopio Zeiss AX10 en el aumento 10X (NA=0.25) y analizadas con el programa *Fiji*. Se muestran células suspendidas pre-tratadas con DMSO (arriba) o con AI-10-104 (104; 2,5 uM) (abajo). c- Porcentaje de células migratorias pre-tratadas con vehículo o con AI-10-104 (2,5 uM), cultivadas en condiciones de suspensión forzada. Se graficó la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ .

Como se observa en la **Figura 27b y c**, la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX también reduce la migración de las células MDA-MB-468 cultivadas en condiciones de suspensión forzada. Esto sugiere que las células tumorales circulantes,

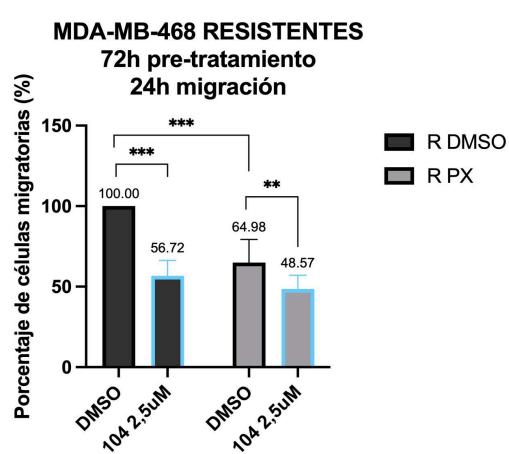
representadas por este modelo, también dependen de la actividad transcripcional de RUNX para migrar en estas condiciones.

Por último, evaluamos la capacidad migratoria en el modelo de células MDA-MB- 468 resistentes a PX. Como se puede observar en la **Figura 28a**, comparamos la migración de las dos poblaciones, control (R DMSO) y resistentes (R PX), tratadas cada una con DMSO o AI-10-104 (104; 2,5 uM) como se detalla en la leyenda de la figura.

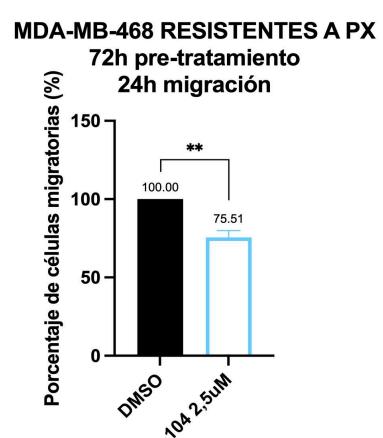
a-



b-



c-



**Figura 28.** a- Imágenes de las membranas conteniendo las células migrantes teñidas con cristal violeta, tomadas con el microscopio Zeiss AX10 en el aumento 10X (NA=0.25) y analizadas con el programa *Fiji*. Células resistentes a PX pre-tratadas con DMSO (arriba) o con AI-10-104 (104; 2,5 uM) (abajo). b- Porcentaje de células migrantes pre-tratadas con vehículo o con AI-10-104 en ambas poblaciones del modelo de células resistentes a PX: población control (R

DMSO) y población resistente a PX (R PX) tomando como 100% a las células migrantes de la población control tratada con DMSO. **c**- Porcentaje de células migrantes pre-tratadas con vehículo o con AI-10-104 2,5 uM en el modelo de células resistentes a PX tomando como 100% a las células migrantes de la población resistente tratada con DMSO. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ .

En la **Figura 28b** observamos que inhibir la actividad transcripcional de RUNX en ambas poblaciones, la control y la resistente a PX, disminuye significativamente la capacidad de migración de las células, al igual que en los modelos de células adheridas y células suspendidas. La **Figura 28c** muestra solo la población resistente, considerando 100% al tratamiento con DMSO, donde la pérdida de función de RUNX disminuye un 25% la capacidad migratoria de las células. Estos resultados muestran que el requerimiento de la actividad transcripcional de RUNX para que estas células resistentes puedan migrar es significativo.

En conjunto, estos resultados indican que la actividad transcripcional de RUNX es necesaria para inducir capacidad migratoria en **todas** las subpoblaciones estudiadas.

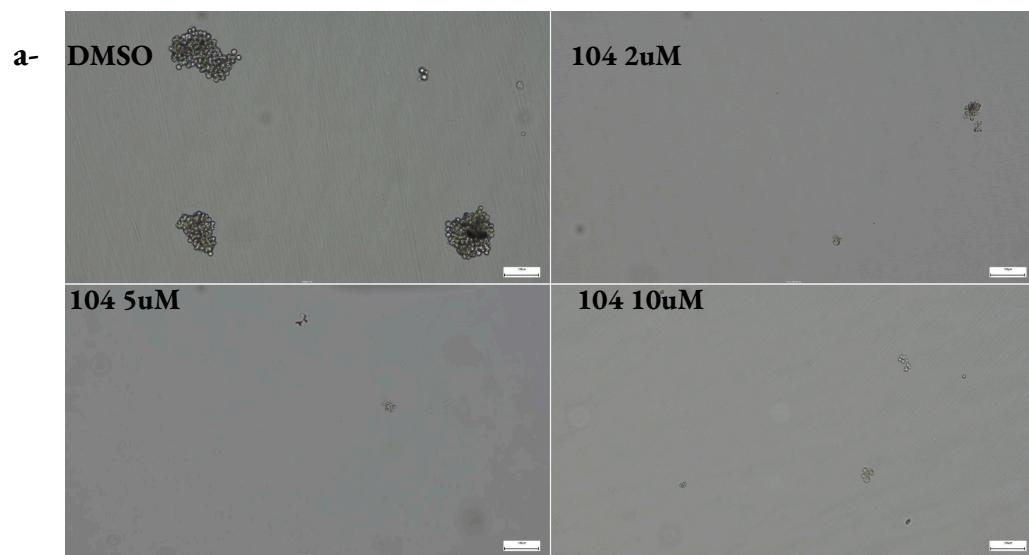
#### **1.4: Evaluación de la capacidad transcripcional de RUNX de modular características de la subpoblación *stem***

Se han desarrollado dos grandes modelos para explicar un posible origen celular del cáncer: el modelo de evolución clonal y el modelo de CSCs (Hui Xu et al., 2022). El modelo de evolución clonal asume que cualquier célula es capaz de acumular mutaciones que conducen a la creación de poblaciones clonales de células dentro de un tumor. Mientras que las células tumorales individuales en un clon comparten un grado de variación genética idéntica, diferentes subpoblaciones de células tumorales tienen la capacidad de mutar individualmente durante la evolución del tumor, mediando así la creación de heterogeneidad tumoral (Puisieux A. et al., 2018; Martincorena I. et al., 2017). El modelo de CSC sostiene que un tumor consiste en un grupo de células madre así como de células que están diferenciadas de las células de origen. Este modelo involucra mutaciones en las células *stem* o progenitoras que pueden explicar la tumorigénesis del cáncer (Fu N. et al., 2014). Las CSCs conforman una de las subpoblaciones resistentes a quimioterapéuticos y se postulan como las responsables de la recurrencia tumoral (Hatina, J., 2012; Marusyk, A., 2020, Yang L 2020, Bhat G 2024). El uso del patrón de expresión CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> junto con la actividad de ALDH, además de enfoques funcionales como la formación de mamósferas o la siembra de tumores en xenoinjertos, se han convertido en los ensayos

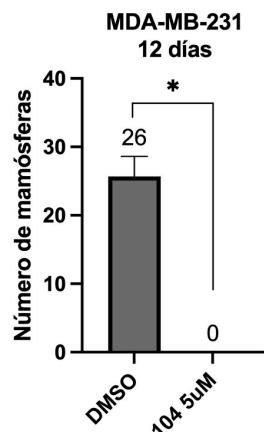
"estándar de oro" para la caracterización de CSC de mama (Liedtke et al., 2013). Los términos "esfera", "tumorsfera" y "oncoesfera" se utilizan como sinónimos para denotar estructuras tridimensionales y esféricas que se originan a partir de células únicas CSCs. Los estudios que tienen como objetivo la evaluación y caracterización *in vitro* de las CSCs suelen realizarse utilizando este modelo (Ishiguro, T. et al., 2017).

Con el fin de evaluar la participación de RUNX en la generación y/o enriquecimiento de CSC, las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en baja densidad para evitar su agregación, en placas no adherentes para que crezcan en suspensión, y en medio rico para promover la generación de mamósferas (medio *stem* mencionado previamente en la sección 1.2). En simultáneo a la siembra, fueron tratadas con dosis menores al IC50 del inhibidor de la actividad transcripcional de RUNX (AI-10-104), o su vehículo (DMSO).

Al cuarto día de cultivo únicamente observamos estructuras esféricas en el pocillo conteniendo las células tratadas con vehículo (DMSO). Incluso, luego de doce días de tratamiento, tiempo sugerido en la mayoría de las publicaciones, reponiendo el medio y los factores necesarios cada tres días, no se observaron mamósferas en el pocillo conteniendo las células tratadas con AI-10-104, independientemente de la dosis (**Figura 27a**). Sí se observaron células individuales sin formar ninguna estructura. Las mamósferas formadas fueron cuantificadas en la **Figura 27b**.



**b-**



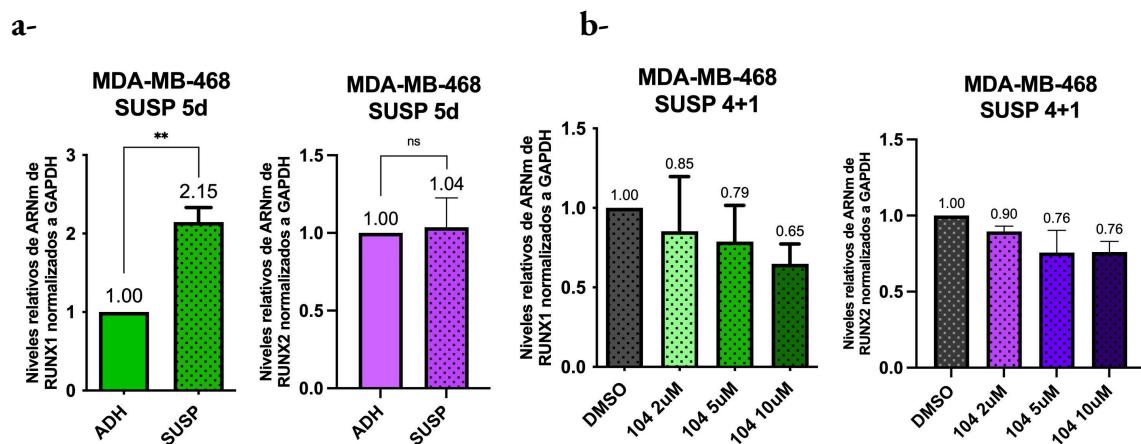
**Figura 29. a-** Campos representativos de las células MDA-MB-231 cultivadas en medio *stem* tratadas durante doce días con DMSO o con AI-10-104 (104) desde el día de plaqueo. Imágenes tomadas en el microscopio óptico Zeiss Ax10 con aumento 10X (NA=0.25). **b-** Recuento de mamósferas cultivadas en medio *stem* tratadas con DMSO o AI-10-104 (104; 5 uM). Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ . Aclaración: este experimento se realizó con las MDA-MB-231 del laboratorio de Roxana Schillaci, presentando un IC50=15uM para AI-10-104.

A partir de este experimento, podemos confirmar que inhibir la actividad transcripcional de RUNX impide la formación de mamósferas sugiriendo fuertemente que esta actividad es necesaria para la polarización hacia un fenotipo *stem* que favorece la formación de dichas estructuras en esta línea celular.

Para profundizar el análisis del efecto de la pérdida de función de RUNX sobre la capacidad de formar mamósferas evaluamos la expresión de genes previamente reportados como relevantes en la generación/enriquecimiento de CSC (Tahsin Nairuz et al., 2023). Dado que bajo el tratamiento de AI-10-104 no se generan mamósferas, y las formadas a partir de DMSO resultan en muy pocas células dificultando la obtención de ARN, modificamos la estrategia experimental de tal manera que conserve la capacidad de enriquecimiento de CSC pero que habilite un mayor número de células y por lo tanto suficiente microgramos de RNA. A continuación realizamos el protocolo experimental de células creciendo en suspensión forzada, que también favorece el enriquecimiento de un fenotipo *stem-like* (como se puede observar en la **Figura 12** (en Materiales y Métodos).

Ha sido validado que los marcadores *stem* son frecuentemente sobre-expresados en las células circulatorias de tumor (CTC), sugiriendo que las metástasis podrían ser provocadas por las subpoblaciones de CTC que expresan estos marcadores de CSC (Aktas et al., 2009). Estas CTC con características *stem-like* son consideradas la “semilla” para tumores secundarios. Por ejemplo, ALDH1 es un marcador *stem* clásico que es frecuentemente sobre-expresado en CTCs de pacientes con cáncer de mama (Reuben et al., 2011; Kasimir-Bauer et al., 2012).

Para evaluar la expresión de genes cultivamos las células MDA-MB-468 durante cinco días, las levantamos, extrajimos RNA, realizamos la RT y medimos la expresión de los mensajeros de interés (**Figura 30**). En primer lugar, comparamos la expresión del ARNm de *RUNX1* y de *RUNX2* entre la población celular adherida y la suspendida. En la **Figura 30a** se observa que la expresión del mRNA de *RUNX1* aumenta significativamente en la población de células en suspensión en comparación con las células adheridas, mientras que la expresión de *RUNX2* permanece sin cambios. Este incremento en la expresión de *RUNX1* sugiere su posible participación en la adquisición del fenotipo *stem*. Por otro lado, el tratamiento con AI-10-104 en células en suspensión provoca una leve disminución en la expresión de ambos mRNAs, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (**Figura 30b**). Este resultado sugiere que RUNX no sería el responsable de regular la expresión de *RUNX1* y *RUNX2* en esta subpoblación en las condiciones establecidas.



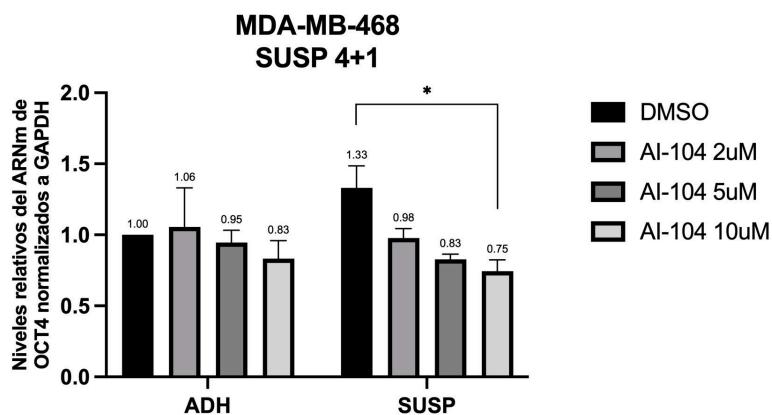
**Figura 30.** **a-** Expresión relativa del ARNm de los genes *RUNX1* y *RUNX2* medida por qPCR en las células MDA-MB-468 comparando la población de células adheridas (ADH) con la población de células suspendidas (SUSP). Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de estos genes en las mismas células crecidas en condiciones estándar. Se graficó las veces de cambio con respecto al modelo de adheridas (n=3). Se graficó la media ± ES (n=3). Se realizó una prueba de t. \*  $p < 0.05$ . **b-** Expresión relativa del ARNm de los genes *RUNX1* y *RUNX2* medida por qPCR en las MDA-MB-468 tratadas con DMSO o con distintas dosis de AI-10-104 (104). Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de estos genes en las mismas células crecidas en condiciones de suspensión forzada. Se graficó las veces de cambio con respecto al modelo de células suspendidas tratadas con vehículo. Se graficó la media ± ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis de AI-10-104. (4+1): después de 4 días desde el plaqueo sin tratamientos seguido de 1 día con tratamiento.

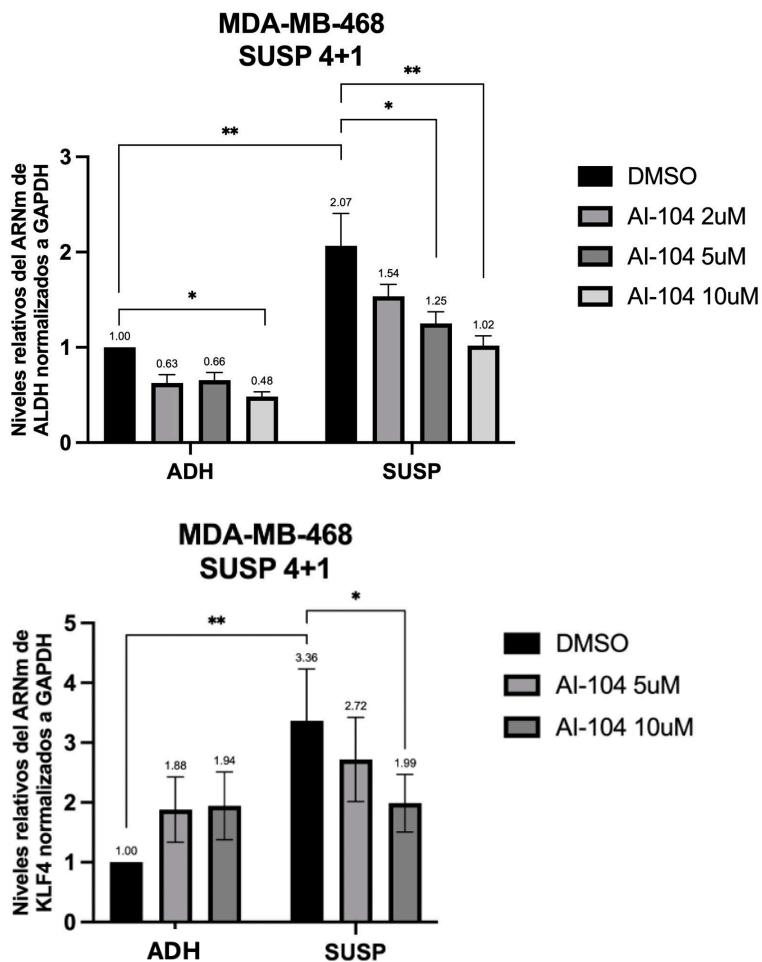
Dado este aumento significativo en la expresión de *RUNX1* en células suspendidas evaluamos a continuación la expresión de genes *stem* frente a la inhibición de su actividad transcripcional. Para ello se sembraron las células MDA-MB-468 en suspensión forzada y al

cuarto día, en el cual observamos que los genes *stem* aumentan su expresión (ver sección Materiales y Métodos - Generación de modelo de células en suspensión forzada - **Figura 13**) se las trató con distintas dosis de AI-10-104 (2 uM, 5 uM y 10 uM). Tras 24 horas de tratamiento, se extrajo RNA, se realizó la transcripción reversa (RT) y posteriormente se llevó a cabo la qPCR para medir la expresión de los genes marcadores de células *stem* reportados: *OCT4*, *ALDH* y *KLF4*.

- El gen *OCT4* se encuentra sobreexpresado en CSCs de mama (Ponti D. et al., 2005).
- El gen *ALDH*, además de ser marcador en CSC de mama (Liedtke et al., 2013; Nakahata K et al., 2015), es marcador de quimioresistencia (Takahashi K. et al., 2006; Huang C-P et al., 2013).
- El gen *KLF4* ha sido reportado como un mediador necesario para generar células CSC-*like* en líneas celulares TNBC (Yu F., et al., 2011). Otros autores reportaron que KLF4 posee en su región promotora sitios de unión para RUNX1 y ha sido identificado como un gen blanco directo de RUNX1 en otras patologías oncológicas (Liu et al., 2019). Nuestro grupo determinó que la expresión de KLF4 es regulada por RUNX en líneas TNBC humanas crecidas en suspensión y en adherencia (Couto FL., et al tesis de licenciatura 2023).

Como se observa en la **Figura 31**, la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX reduce significativamente la expresión de todos los genes elegidos para analizar (*OCT4*, *ALDH* y *KLF4*) en la población de células en suspensión (SUSP), en comparación con el tratamiento con el vehículo. En contraste, también en la población de células adheridas (ADH), se observa una disminución en la expresión de *ALDH* tras el tratamiento con la mayor concentración de AI-10-104.





**Figura 31.** Expresión relativa del ARNm de los genes *OCT4*, *ALDH1A1* y *KLF4* medida por qPCR en las MDA-MB-468 tratadas con DMSO o con distintas dosis de AI-10-104 (durante 24h) en el modelo de adheridas (ADH) y de suspendidas (SUSP). Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de estos genes en las mismas células crecidas en condiciones estándar (adheridas o ADH) tratadas con DMSO. Se graficó las veces de cambio. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis de AI-10-104. SUSP: células suspendidas. (4+1): después de 4 días desde el plaqueo sin tratamientos seguido de 1 día con tratamiento.

Estos resultados, junto con los descriptos en el experimento de mamósferas, sugieren que RUNX está involucrado en la regulación de la expresión de genes asociados a la adquisición del fenotipo *stem*: *ALDH*, *OCT4* y *KLF4*, siendo *KLF4* un posible blanco directo de esta regulación. Dado que las células en suspensión presentan un aumento en la expresión de *RUNX1*, y *RUNX2* no se modifica, este fenotipo podría ser principalmente modulado por *RUNX1*.

## 1.6: Participación de RUNX en el fenómeno de latencia tumoral o *dormancy*

Es posible que, tras la diseminación y asentamiento en órganos distantes, las células tumorales que no pueden reproducir su nicho de expansión entren en un programa de latencia o “*dormancy*” (Aguirre-Guiso et al., 2006). Esto podría representar una respuesta adaptativa a un microambiente no propicio (Miller AK et al, 2021). Como mencionamos en la introducción, las células tumorales que no son aptas para sobrevivir a la diseminación pueden ser eliminadas rápidamente por apoptosis y las células tumorales que tienen todas las herramientas para reanudar el crecimiento lo harán. Asimismo en la clínica se observa un tercer escenario en el que las alteraciones genéticas y/o epigenéticas en las células tumorales no favorecen el crecimiento inmediato, pero proporcionan una ventaja selectiva a través de la adaptación al estrés (por ejemplo, hipoxia, hiperoxia, baja disponibilidad de nutrientes, quimioterapia) donde las vías que permiten a las células adaptarse al estrés detendrían el crecimiento de las células tumorales hasta que las condiciones sean nuevamente favorables. Entonces, las células se retiran del ciclo celular y permanecen quiescentes evadiendo la quimioterapia e incluso el sistema inmune (Park and Nam, 2020; Muhammad Tufail et al., 2025) (Ver sección **Introducción - Metástasis**).

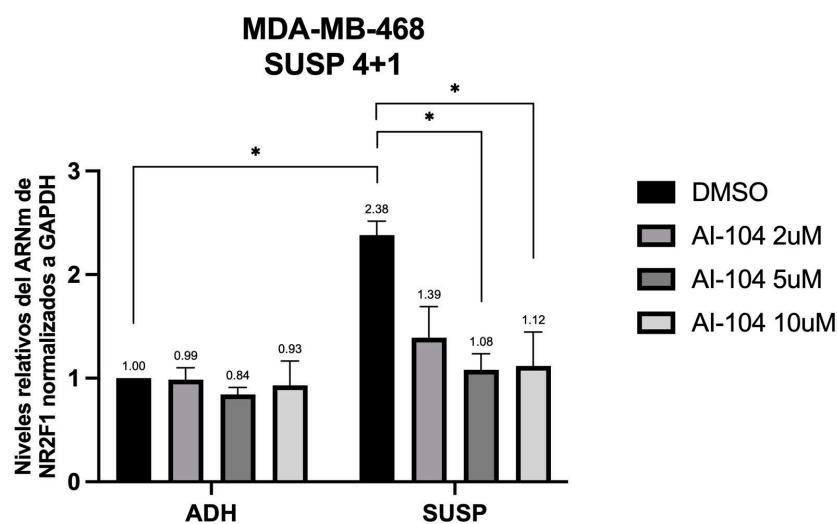
Un marcador identificado en la regulación de *dormancy* es la proteína NR2F1 (Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1), la cual está sobreexpresada en modelos experimentales de *dormancy* en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y en células tumorales diseminadas de pacientes con cáncer de próstata que han mantenido la enfermedad en estado latente durante 7 a 18 años. Ha sido reportado que cuando la expresión de *NR2F1* es bloqueada *in vivo*, se interrumpe el arresto del crecimiento o la supervivencia de las células tumorales (carcinoma de células escamosas) diseminadas en *dormancy* (MS Sosa et al., 2015). En ratones, el tratamiento con un agonista específico de NR2F1 resultó en la inhibición de la metástasis pulmonar de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Khalil et al., 2021).

Nos interesó evaluar si el factor de transcripción en estudio es capaz de modular la expresión del marcador **NR2F1** en nuestro sistema de células en suspensión. Esta evaluación se basó en dos observaciones de esta tesis: 1) *NR2F1* muestra una expresión significativamente mayor en las células en suspensión (SUSP) comparado con la población adherente (ADH) (**Figura 32a**); 2) estas células crecen en un ambiente cuyas condiciones no son “óptimas”, pero aun así logran sobrevivir, tal como sucede en el fenómeno de *dormancy*. Las condiciones no son óptimas debido a que estas células, que normalmente crecen en

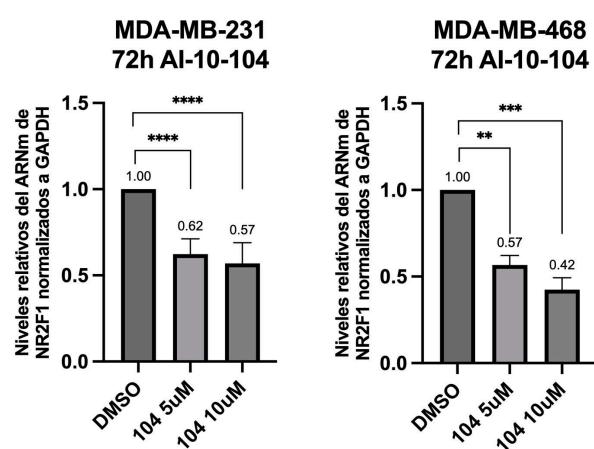
adherencia sin experimentar apoptosis, presentan niveles mayores de apoptosis cuando se cultivan en suspensión (**Tabla 3 - DMSO**).

Por lo tanto, medimos la expresión de este gen luego de tratar ambas líneas con AI-10-104, tanto en el modelo de células adheridas como en el de células suspendidas. Para el modelo de células suspendidas, al igual que con los genes *stem*, se sembraron las células en suspensión forzada y al cuarto día, en el cual observamos que los genes *stem* aumentan su expresión (ver sección Materiales y Métodos - Generación de modelo de células en suspensión forzada - **Figura 13**) se las trató con distintas dosis de AI-10-104 (2 uM, 5 uM y 10 uM). Tras 24 horas de tratamiento, se extrajo RNA, se realizó la transcripción reversa (RT) y posteriormente se llevó a cabo la qPCR.

a-



b-



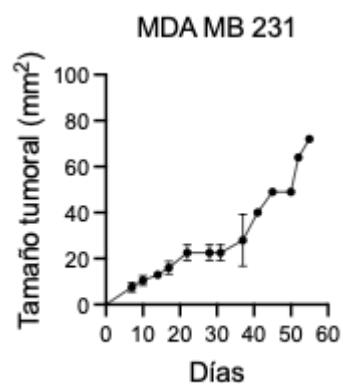
**Figura 32.** Expresión relativa del ARNm del gen NR2F1 medida por qPCR en las **a-** MDA-MB-468 adheridas versus suspendidas tratadas con DMSO o con distintas dosis de AI-10-104 durante 24 horas (4+1): después de 4 días desde el plaqueo sin tratamientos seguido de 1 día con tratamiento) y **b-** MDA-MB-468 adheridas tratadas durante 72 horas con DMSO o con AI-10-104 (5 y 10 uM). Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las mismas células crecidas en condiciones estándar (adheridas) tratadas con DMSO. Se graficó las veces de cambio. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada dosis de AI-10-104.

Nuestros datos muestran que el aumento de *NR2F1* en la población suspendida parece estar regulado por RUNX dado que el uso del inhibidor reduce estos niveles de mensajero a los niveles basales observados en las células adheridas (**Figura 32a**). La expresión de ARNm de *NR2F1* también disminuye en las células adheridas inhibiendo la actividad transcripcional de RUNX durante 72 horas (**Figura 32a**).

Por lo tanto, RUNX estaría involucrado en favorecer un fenotipo de *dormancy* regulando positivamente la expresión del gen central *NR2F1*.

### 1.7: Ensayo *ex vivo*

Los datos presentados hasta este punto nos sugieren que el uso del inhibidor transcripcional de RUNX es favorable para modular marcadores de progresión tumoral: A) reduce la sobrevida y migración en todas las subpoblaciones celulares evaluadas B) reduce el fenotipo *stem* y un marcador de *dormancy*. Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue pasar a un modelo más complejo que las líneas celulares en cultivo. En colaboración con el laboratorio de la Dra. Claudia Lanari, Dra. Cecilia Pérez Piñero y la Lic. M. Sol Rodriguez, se inocularon subcutáneamente 4 millones de células MDA-MB-231 en un ratón NSG Jackson. Estos ratones tienen como característica estar inmunosuprimidos para evitar el rechazo de las células tumorales humanas por ser de otra especie. El tumor creció en el ratón aproximadamente hasta los 80 mm<sup>2</sup> después de 55 días, como se puede ver en la **Figura 33**.



**Figura 33.** Tamaño tumoral generado por inoculación de 4 millones de MDA-MB-231 en ratón NSG Jackson en función de los días.

El tumor fue extraído, cortado en pequeñas láminas e incubado sobre las esponjas embebidas en el medio con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 5 uM por 48 horas (alrededor de 6 láminas por tratamiento). Estas esponjas junto con las láminas del tumor

fueron colocadas dentro de una placa de 12 wells en la estufa con 5% CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura. Pasado este tiempo, se lavaron las láminas de tumor con PBS 1X, se armaron tacos de parafina y se enviaron al STAN de Asesoramiento Integral en el Manejo de Tejidos y Técnicas de Inmunohistoquímica (Código: 5338) del IBYME-CONICET. Incluimos en parafina un control de tiempo 0, es decir, láminas de tumor sin cultivar *ex vivo* para tener el estado de los tumores al salir del ratón y ser cortados en cultivo. También se realizó una necropsia de pulmones, hígado, páncreas y riñón.

En la evaluación técnica se realizó una marcación inmunohistoquímica en forma automatizada con protocolos estandarizados para instrumento BenchMarck de Ventana.

En la necropsia, se encontraron micrometástasis en pulmón, confirmando que las células tumorales crecieron *in vivo* como ha sido reportado (Yin X. et al., 2021; Demeule M. et al., 2021; Wang, Le et al., 2015; Wang YH et al., 2021). Se contabilizó el número de células proliferando con la marcación nuclear con Ki67 en 30 campos de gran aumento y al azar, para cada caso. No se contabilizó la marcación de Ki67 en núcleos picnóticos.

Tratamiento	% de necrosis	% de células viables	ki67/30 CGA
Tiempo 0	35	65	45
DMSO	65	35	25
AI-10-104 5uM	75	25	30

Tabla 4. Porcentaje de necrosis, de células viables y de marcación con ki67 para cada tratamiento.

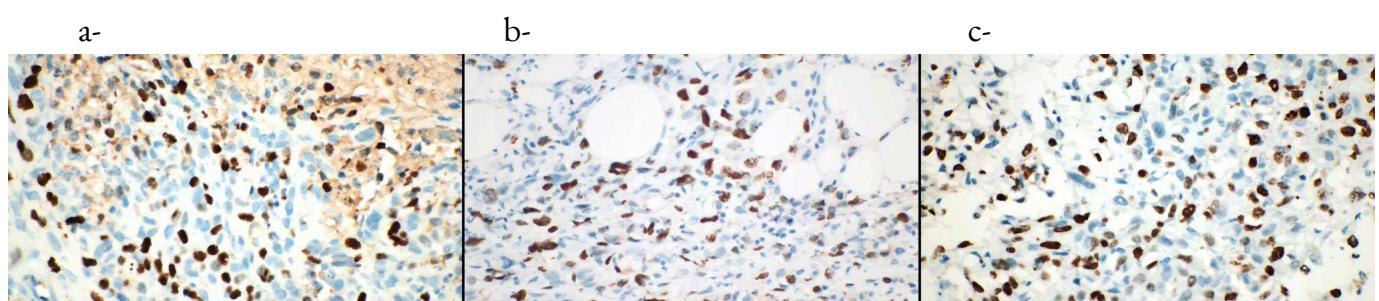


Figura 34. Imágenes representativas de distintos campos pertenecientes a cada tratamiento con marcación de ki67. a- Tiempo 0, b- DMSO, c- AI-10-104 5uM.

Como se observa en la **Tabla 4**, el % de necrosis aumenta y el % de viabilidad celular disminuye en los explantos tratados con inhibidor de la actividad transcripcional de

RUNX, reproduciendo el efecto observado en el cultivo celular. La marcación con ki67 no se ve afectada con el tratamiento, es decir que en este ensayo *ex-vivo* la proliferación no se modifica al perder la función de RUNX. Este experimento fue realizado una única vez por falta de disponibilidad de ratones, está en los planes futuros repetirlo.

### **Conclusiones del objetivo 1:**

En base a los datos experimentales generados en esta sección concluimos que inhibir la actividad transcripcional de RUNX:

- Disminuye la viabilidad/supervivencia de las células crecidas en condiciones estándar (adheridas).
- Aumenta los niveles de apoptosis en las células tumorales crecidas en condiciones estándar y en suspensión forzada.
- Disminuye la migración celular en el modelo de células adheridas, suspendidas y resistentes a PX.
- Impide la formación de mamósferas y disminuye la expresión de genes *stem* en el modelo de células en suspensión, en el cual la expresión de *RUNX1* se encuentra aumentada y la de *RUNX2* no se modifica con respecto a la población adherida.
- Disminuye la expresión del marcador de *dormancy* *NR2F1*, en el modelo de células en suspensión, donde la expresión de este gen se encuentra aumentada con respecto a la población adherida. En el modelo de adheridas, luego de 72 horas de tratamiento con el inhibidor también disminuye la expresión de *NR2F1*.

En conjunto, estas observaciones sugieren fuertemente que **RUNX favorece un comportamiento agresivo** en nuestro modelo de estudio analizando las cuatro subpoblaciones celulares TNBC derivadas de MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

## Objetivo 2:

**Estudiar la sensibilidad de las líneas celulares humanas de TNBC a drogas quimioterapéuticas al reducir la actividad transcripcional de RUNX.**

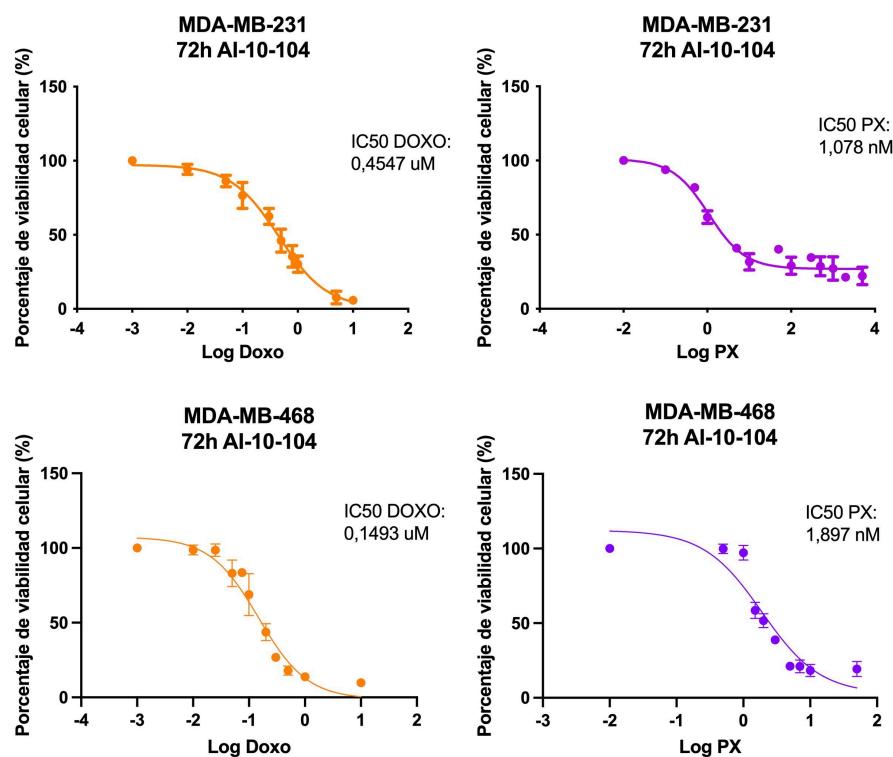
Hasta hace algunos años, debido a la ausencia de blancos específicos, las pacientes con TNBC solo tenían disponible como tratamiento de primera línea cirugía, rayos o quimioterapia (Narod et al., 2015). Actualmente, con el avance de las nuevas estrategias terapéuticas, la mayoría de los tumores TNBC se tratan con quimioterapia (QT) combinada o no con inmunoterapias, como pembrolizumab (anticuerpo anti PD-1). En casos de pacientes con mutación gBRCA1/2 (g: mutación germinal) y TNBC de alto riesgo (clasificado como ausencia de pCR o estadios patológicos II-III), se recomienda administrar un año de olaparib (inhibidor de PARP) como tratamiento adyuvante (Cardoso et al., 2024). En particular, la **doxorrubicina** (Doxo) y el **paclitaxel** (PX) son drogas quimioterapéuticas de base antraciclinas y taxanos respectivamente, más comúnmente usados en etapas tempranas de tratamiento (Cardoso et al., 2017). Estas drogas son tratamientos de uso estandarizado dados sus bajos costos y buenas respuestas iniciales (Loibl, S. et al., 2024). Dado que la hipótesis de nuestro laboratorio propone que RUNX podría estar involucrado en la generación de una subpoblación resistente a drogas evaluamos la participación de la actividad transcripcional de RUNX durante el tratamiento con las drogas quimioterapéuticas más comúnmente usadas.

### 2.1: Búsqueda de la dosis de trabajo de Doxorrubicina y de Paclitaxel

En primer lugar, se estableció la dosis de trabajo para cada línea celular y cada fármaco (doxorrubicina: Doxo y paclitaxel: PX) mediante ensayos de viabilidad celular, utilizando tinción con cristal violeta, y evaluación de apoptosis/necrosis, a través de la detección con Anexina V Cy5 e Ioduro de Propidio. Estos análisis permitieron definir las concentraciones óptimas para los experimentos de esta sección.

A partir de los ensayos de cristal violeta, se calcularon los valores de IC50 de doxo y de PX para cada línea (**Figura 35**). La viabilidad celular, tal como esperábamos, disminuye al

aumentar la concentración de cada droga, lo cual nos indica su efectividad como droga quimioterapéutica.



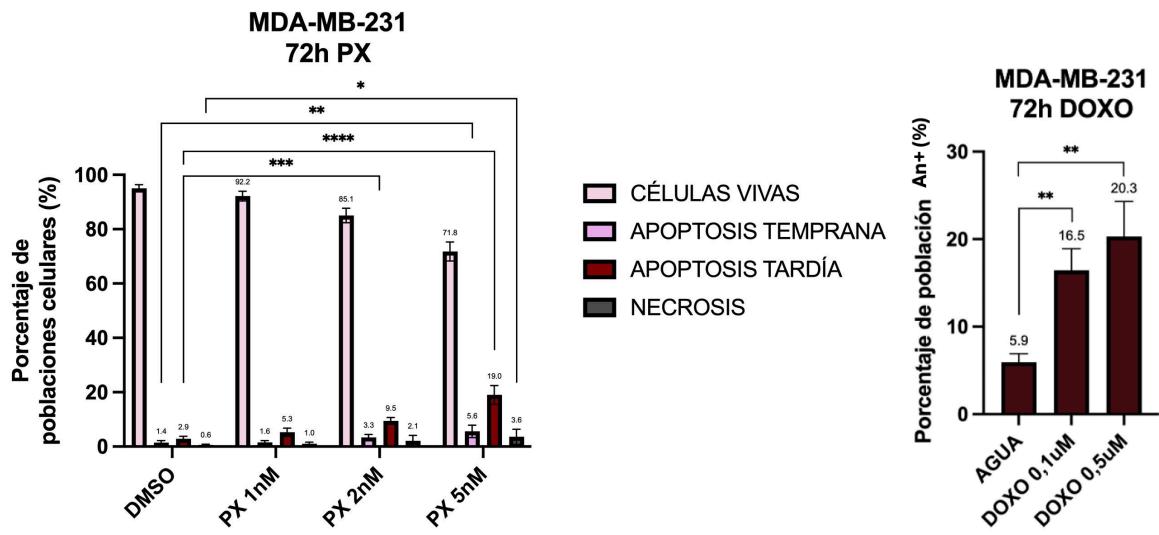
**Figura 35.** Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de concentraciones crecientes de doxorrubicina (Doxo) y de paclitaxel (PX) en las líneas celulares humanas MDA-MB-231 y MDA-MB-468. El valor de IC<sub>50</sub> es obtenido a partir de una transformación logarítmica de las concentraciones de Doxo y PX y una regresión no lineal en el programa *GraphPad*. Los IC<sub>50</sub> calculados se encuentran anotados arriba a la derecha de cada gráfico.

Se evaluaron mediante citometría de flujo las cuatro subpoblaciones celulares que mencionamos en la sección de **resultados 1.2**: An<sup>-</sup>IP<sup>-</sup> (células vivas no apoptóticas), An<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> (apoptosis temprana), An<sup>+</sup>IP<sup>+</sup> (apoptosis tardía) y las An<sup>-</sup>IP<sup>+</sup> (necrosis) para las células tratadas con paclitaxel. En el caso de la droga doxorrubicina, se evaluó sólo la población An<sup>+</sup> (apoptosis temprana y tardía) ya que esta molécula emite fluorescencia en longitudes de onda muy cercanas a las que emite la Anexina V Cy5, con lo cual habría una superposición de fluorescencias provenientes de distintos orígenes. Como se observa en la **Figura 36**, se analizaron las células MDA-MB-468 adheridas (ADH) y suspendidas (SUSP), y las MDA-MB-231 adheridas (ADH).

#### A- MDA-MB-231 adheridas

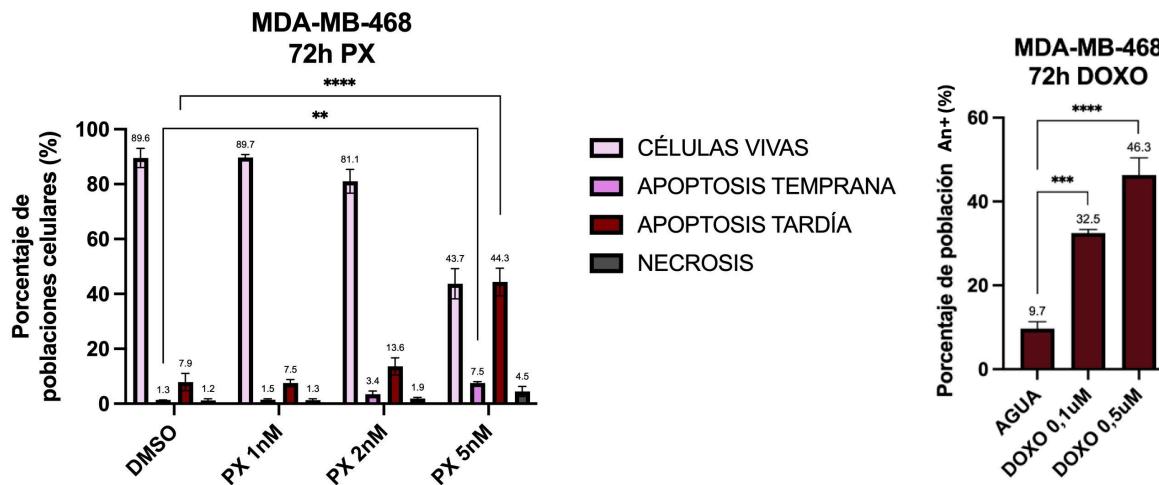
a-

b-



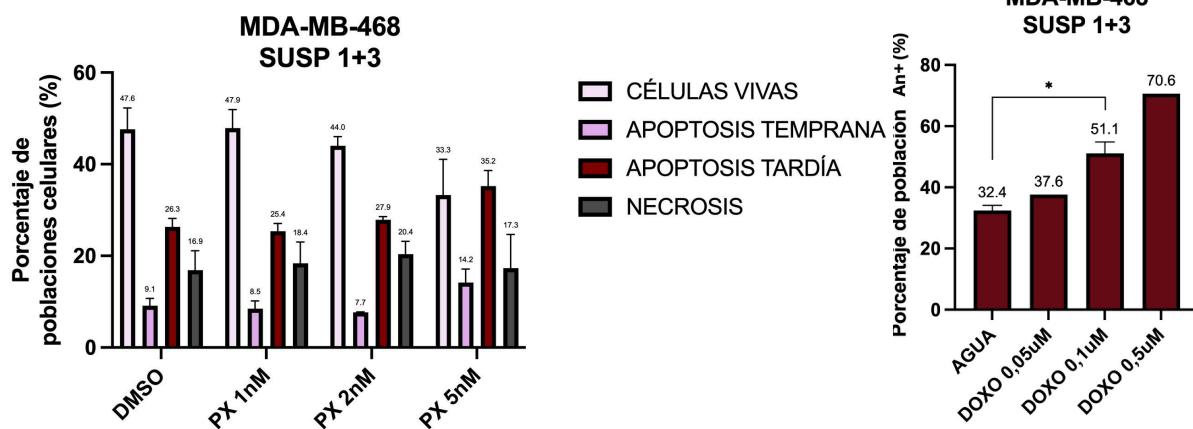
**B- MDA-MB-468 adheridas**

a-



**C- MDA-MB-468 suspendidas**

a-



b-

**MDA-MB-468  
SUSP 1+3**

**Figura 36.** Porcentaje de subpoblaciones celulares en **A-** MDA-MB-231 y **B-** MDA-MB-468 cultivadas en condiciones estándar (adheridas o ADH) tras tratar las células durante 72 horas con vehículo (DMSO) o con distintas dosis de PX y

DOXO; y C- MDA-MB-468 cultivadas en condiciones de suspensión forzada (SUSP) tras tratar las células durante 3 días con vehículo (DMSO) o con distintas dosis de PX y DOXO **a**- Porcentaje de células vivas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas tras el tratamiento con PX. **b**- Porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía tras el tratamiento con DOXO. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák en el caso de **a**- y One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para el caso de **b**- para evaluar el efecto de cada dosis de PX y DOXO. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

A continuación, se muestran los porcentajes de apoptosis y necrosis de los distintos tratamientos en ambas líneas celulares:

MDA-MB-468	CÉLULAS ADHERIDAS	CÉLULAS SUSPENDIDAS
<b>DMSO</b>	10,4%	52,3%
<b>PX 1nM</b>	10,3%	52,3%
<b>PX 2nM</b>	18,9%	56%
<b>PX 5 nM</b>	28,2%	66,7%
<b>AGUA</b>	9,7%	32,4%
<b>DOXO 0,1uM</b>	32,5%	51,1%
<b>DOXO 0,5uM</b>	46,3%	70,6%

**Tabla 5.** Porcentaje de apoptosis temprana+apoptosis tardía+necrosis en las MDA-MB-468 adheridas y suspendidas tratadas con distintas dosis de PX y porcentaje de apoptosis temprana y tardía de DOXO (y de sus vehículos).

MDA-MB-231	CÉLULAS ADHERIDAS
<b>DMSO</b>	4,9%
<b>PX 1nM</b>	7,9%
<b>PX 2nM</b>	14,9%
<b>PX 5nM</b>	28,2%
<b>AGUA</b>	5,9%
<b>DOXO 0,1uM</b>	16,5%
<b>DOXO 0,5uM</b>	20,3%

**Tabla 6.** Porcentaje de apoptosis temprana+apoptosis tardía+necrosis en las MDA-MB-231 adheridas tratadas con distintas dosis de PX y porcentaje de apoptosis temprana y tardía de DOXO (y de sus vehículos).

Una vez obtenidos los valores de IC50 y los porcentajes de apoptosis de cada droga quimioterapéutica para cada línea celular, procedimos con los experimentos, eligiendo dosis que sean menores al IC50 o no induzcan más del 50% de muerte celular.

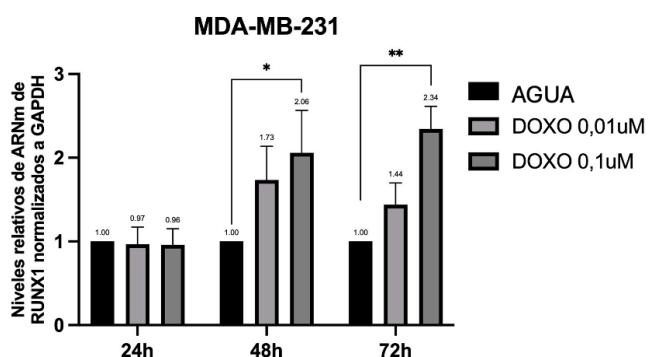
## 2.2: Evaluación de la expresión de genes de interés luego del tratamiento con drogas quimioterapéuticas

A continuación, ambas líneas celulares fueron tratadas con doxorrubicina o paclitaxel con las dosis y tiempos detallados en la **Figura 35 y 36**. Posteriormente, se extrajo RNA, se realizó la RT y se evaluó la expresión de distintos genes de interés mediante qPCR, incluyendo *RUNX1*, *KLF4* y *GJA1*.

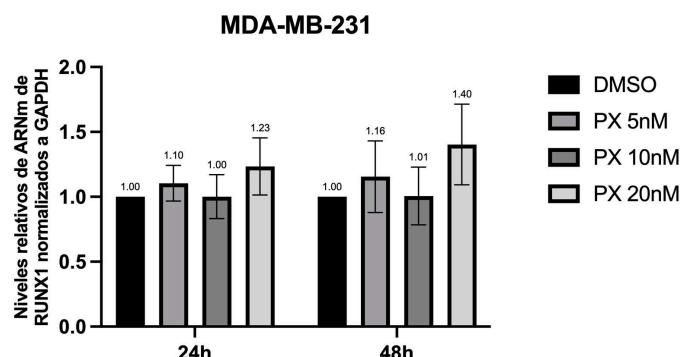
Como se puede observar en la **Figura 37**, la expresión de mRNA de *RUNX1* aumenta en MDA-MB-231 tratadas con doxorrubicina y en MDA-MB-468 tratadas con PX en forma dosis y tiempo dependiente.

### A-MDA-MB-231

a-

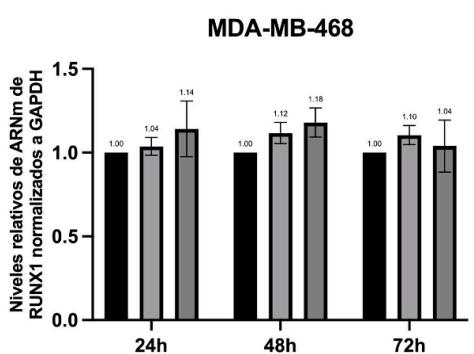


b-

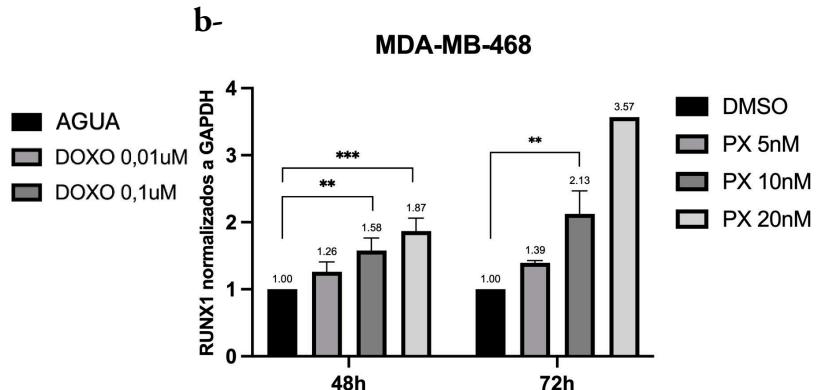


### B-MDA-MB-468

a-

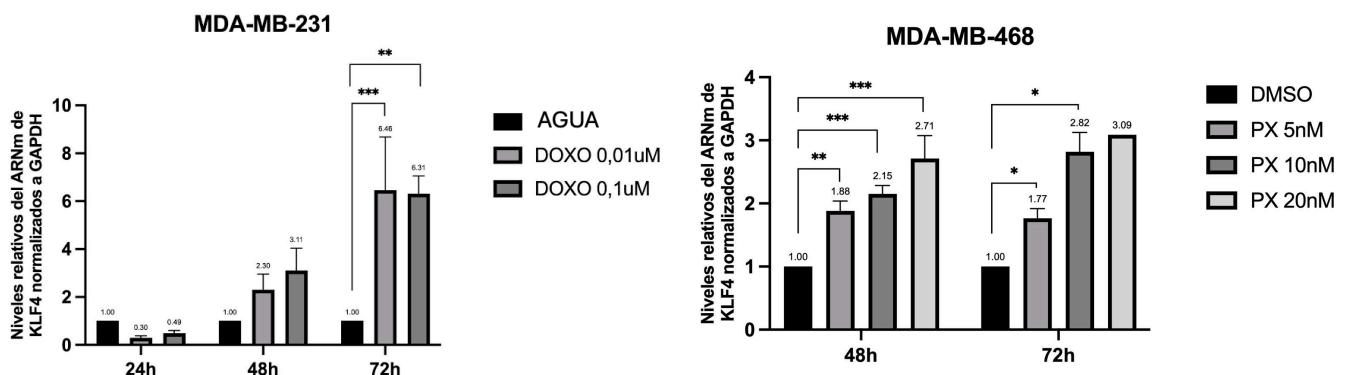


b-



**Figura 37.** Expresión relativa del ARNm del gen *RUNX1* medida por qPCR en **A-** células MDA-MB-231 adheridas tratadas durante 24, 48 y 72 horas con **a-** agua o doxorrubicina (DOXO 0,01 y 0,1 uM) o con **b-** DMSO o PX (5, 10 y 20 nM) y en **B-** MDA-MB-468 adheridas tratadas durante 24, 48 y 72 horas con **a-** agua o doxorrubicina (DOXO 0,01 y 0,1 uM) o con **b-** DMSO o PX (5, 10 y 20 nM). Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con vehículo (agua o DMSO). Se graficó las veces de cambio y la media ± ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de DOXO o PX. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

A continuación medimos la expresión del mRNA de *KLF4* (**Figura 38**). En estudios de resistencia a quimioterapia, usando líneas celulares humanas de osteosarcoma, la expresión de *KLF4* está significativamente aumentada frente al tratamiento con doxorrubicina promoviendo la generación de células CSC-*like* (Li Yangling et al., 2017).

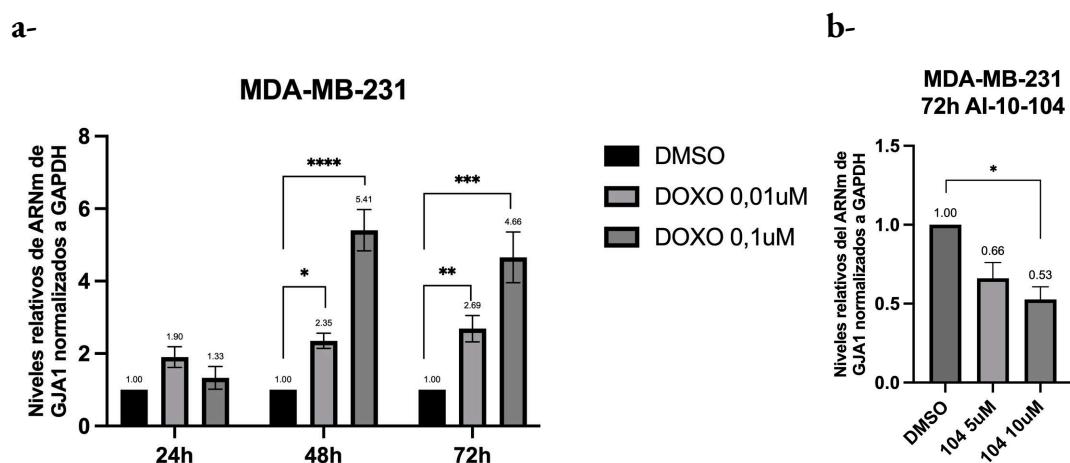


**Figura 38.** Expresión relativa del ARNm del gen *KLF4* medida por qPCR en MDA-MB-231 adheridas tratadas durante 24, 48 y 72 horas con agua o doxorrubicina (DOXO 0,01 y 0,1 uM) y en MDA-MB-468 adheridas tratadas con DMSO o PX (5, 10 y 20 nM) durante 24, 48 y 72 horas. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con DMSO. Se graficó las veces de cambio y la media ± ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de DOXO o PX. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Como se observa en la **Figura 38** la expresión de ARNm de *KLF4* también aumenta en las MDA-MB-231 tratadas con doxorrubicina y en las MDA-MB-468 tratadas con PX de forma dosis y tiempo dependiente. Si bien estamos midiendo un solo marcador *stem* central, este aumento podría sugerir la adquisición de un fenotipo *stem* en las células TNBC tratadas con quimioterapia. Ha sido reportado previamente que la quimioterapia induce en células cancerosas un fenotipo *stem* aumentando la expresión de genes involucrados en este fenómeno (Xingwang Hu et al., 2012; Khalid Abubaker et al., 2013; C. D'Alterio et al., 2020). Por ejemplo, paclitaxel induce la expresión de genes de pluripotencia como *KLF4* en

las MDA-MB-231 a través de un mecanismo epigenético mediado por HIF-1/S100A10 y KDM6A (Lu H. et al., 2020).

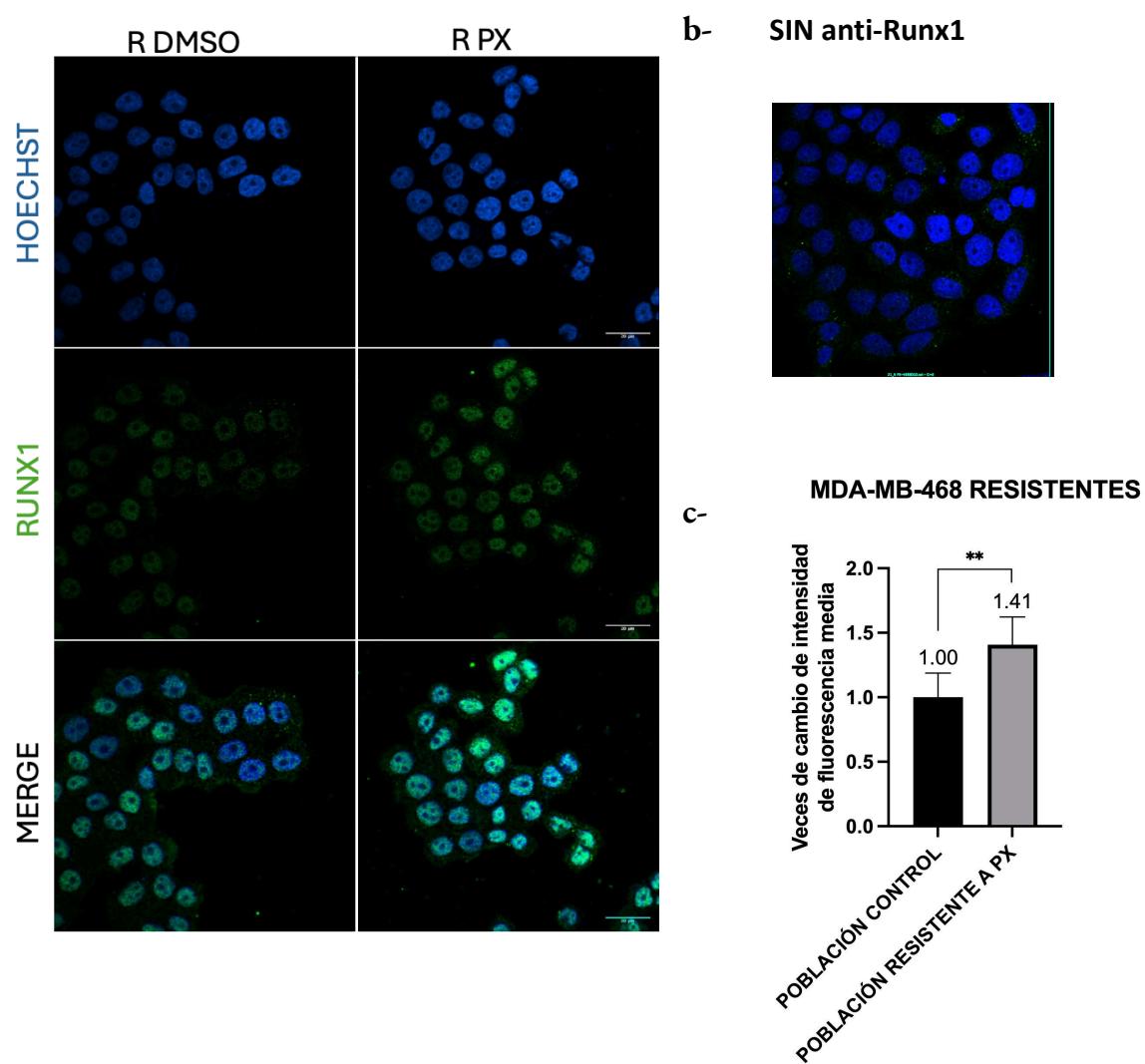
Luego medimos la expresión del mRNA de *GJA1*. En un principio, lo consideramos marcador de adherencia entre células. Como ya vimos en la **sección 1.4**, inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la migración celular. Además, el paper de Sol Recouvreux de nuestro grupo mostró mediante la técnica de ChIP que RUNX1 se une a la región promotora de *GJA1* en la línea celular MDA-MB-231. Más aún, células transfectadas con una construcción dominante negativa de *RUNX1* aumentan los niveles de *GJA1*, mostrando un rol inhibitorio de RUNX1 sobre la expresión génica de *GJA1* (Recouvreux et al., 2016). Sin embargo, durante el desarrollo de estas tesis, inhibir la actividad transcripcional de RUNX en las células MDA-MB-231 disminuye la expresión de *GJA1* (**Figura 39b**). Es decir que RUNX promueve la expresión de *GJA1*, y es posible que RUNX2 esté involucrado dado que el DN bloquea exclusivamente la actividad de *RUNX1*. Por otro lado, medimos la expresión de *GJA1* en células tratadas con doxorrubicina (**Figura 39a**).



**Figura 39.** **a-** Expresión relativa del ARNm de *GJA1* medida por qPCR en MDA-MB-231 tratadas con doxorrubicina (DOXO) a distintos tiempos. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con DMSO. Se graficó las veces de cambio y la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó Two-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de DOXO. **b-** Expresión relativa de ARNm de *GJA1* normalizado a la expresión de *GAPDH* medida por qPCR en MDA-MB-231 tratadas con AI-10-104. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con DMSO. Se graficó las veces de cambio y la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de AI-10-104. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Continuando con el estudio de la expresión de *RUNX1* bajo los efectos de drogas quimioterapéuticas, nos interesó evaluar la expresión de la proteína de *RUNX1* en la población celular resistente a PX generada con la línea MDA-MB-468. Realizamos una inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico contra *RUNX1*, usando Alexa 488 como anticuerpo secundario y observamos la tinción en el microscopio confocal Zeiss LSM980 (**Figura 40a**). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia mediante el programa de *ImageJ* (**Figura 40c**).

**a-**



**Figura 40.** **a-** Evaluación de la expresión proteica de *RUNX1* evaluada por inmunofluorescencia en la línea MDA-MB-468 DMSO (izquierda R DMSO) y resistente a PX (derecha R PX). Se muestran campos representativos con HOECHST en azul, *RUNX1* en verde y la superposición de ambos (merge). **b-** Control de fluorescencia: MDA-MB-468 sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario (Alexa 488). **c-** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de *RUNX1* nuclear usando máscaras binarias a partir de la imagen de HOECHST para

determinar los núcleos y medir así la intensidad de fluorescencia. Se graficó la media de las veces de cambio  $\pm$  ES (n=3). Se realizó un t test,  $^{**}p < 0.01$ .

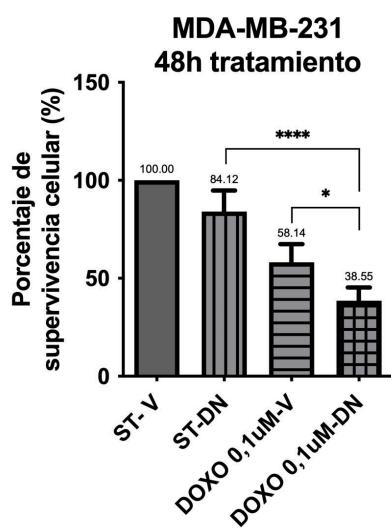
En esta figura se observa que las células resistentes a PX (R PX) expresan niveles significativamente más altos de la proteína RUNX1 en comparación con las células control (R DMSO). El aumento significativo de la expresión del ARNm de RUNX1 tras el tratamiento con PX, junto con el aumento significativo de la expresión de la proteína RUNX1 en la población resistente a PX, sugiere que este factor de transcripción podría desempeñar un papel clave en la adquisición de resistencia a este fármaco en la línea celular MDA-MB-468

### **2.3: Efecto de la combinación de drogas quimioterapéuticas con el inhibidor de la actividad transcripcional de RUNX**

Nuestra siguiente pregunta fue: dado que la expresión de RUNX1 aumenta frente al tratamiento quimioterapéutico e incluso cuando las células son resistentes al mismo, ¿Podremos generar un efecto más tóxico de la droga quimioterapéutica al inhibir la actividad transcripcional de RUNX?

Para responder esta pregunta utilizamos un plásmido conteniendo una secuencia incompleta de RUNX1 generando un dominante negativo de RUNX1 (pcdna3.1 DN-R). Esta construcción tiene un codón STOP prematuro en la región codificante para la zona de transactivación dentro de la secuencia de ADNc de RUNX1. La proteína trunca resultante heterodimeriza con la proteína RUNX1 endógena bloqueando su actividad transcripcional. Este plásmido fue previamente utilizado en nuestro laboratorio y reportado en Recouvreux et al. (2016).

Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con el plásmido DN-R (o con el plásmido vacío o V) y tratadas con doxorrubicina simultáneamente o los tratamientos por separado (transfección y droga solas), durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo, se contó el número de células sobrevivientes en cada tratamiento utilizando la tinción de células con *trypan blue* y una cámara de Neubauer. Las células transfectadas con el plásmido vacío (V) se usaron como control.



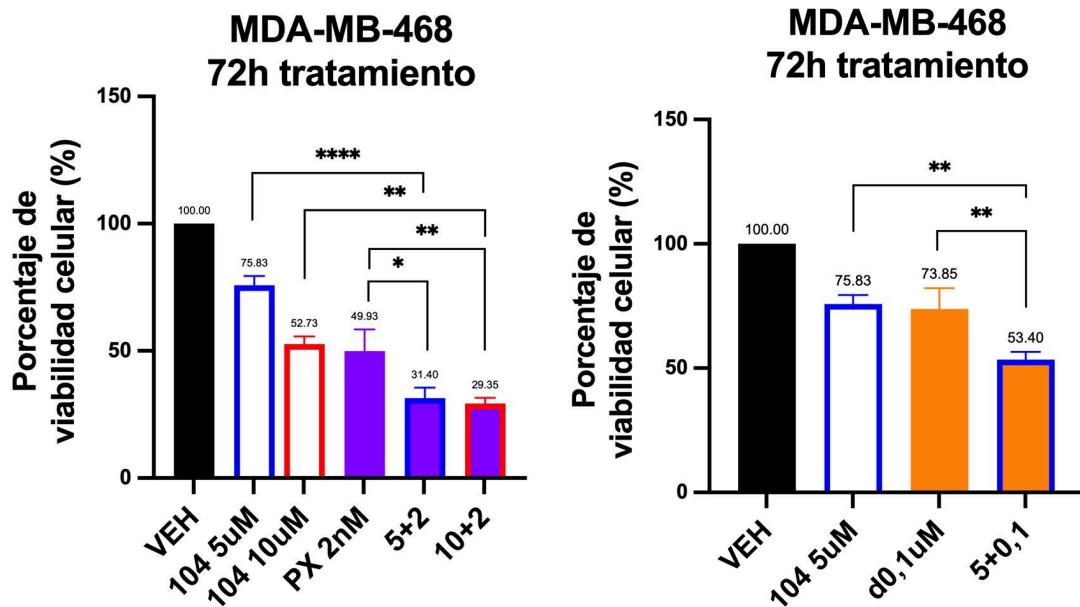
**Figura 41.** Porcentaje de células MDA-MB-231 que sobrevivieron a los distintos tratamientos. Las células fueron contadas en la cámara de Neubauer. Se graficó la media de las veces de cambio  $\pm$  ES ( $n=4$ ). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de DOXO y del plásmido dominante negativo. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Como se observa en la **Figura 41**, la supervivencia celular disminuye significativamente al combinar la doxorrubicina y la pérdida de función de RUNX1 (barra gris cuadriculada) comparado con la supervivencia observada en cada tratamiento por separado (barra con líneas horizontales y barra con líneas verticales).

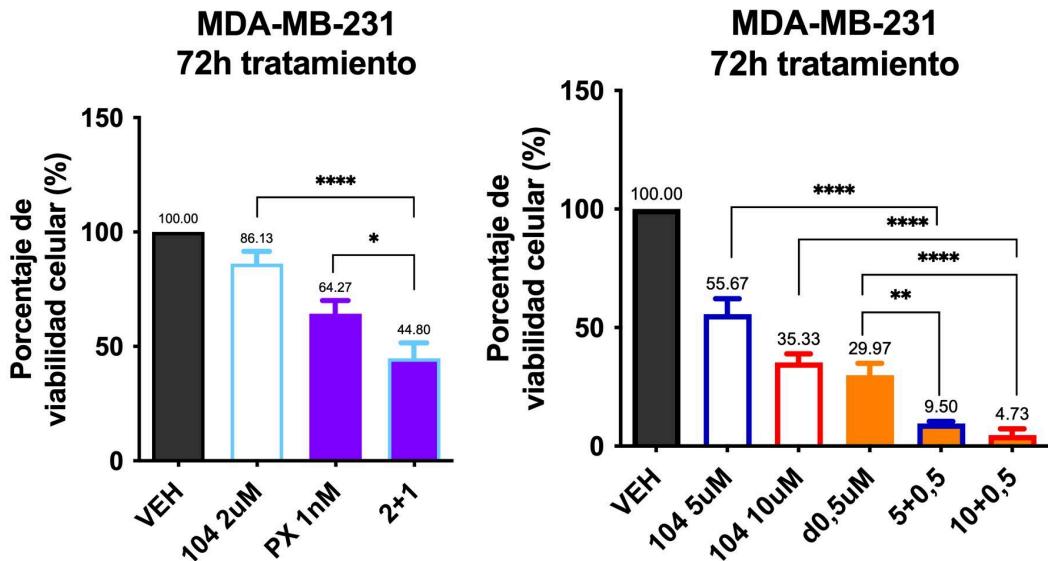
Dado que el % de transfección en la línea MDA-MB-231 es alrededor del 20%, utilizamos el inhibidor comercial de la interacción entre RUNX y CBF $\beta$ , ya evaluado en el objetivo anterior que, al ser una droga soluble en el medio de cultivo, consideramos que impacta en todas las células de forma más homogénea que la transfección.

A continuación, tratamos ambas líneas celulares, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, con el inhibidor AI-10-104 y con las drogas quimioterapéuticas, o con los tratamientos mencionados de forma individual. Esperamos 72 horas y evaluamos la sobrevida mediante un ensayo de cristal violeta. En los gráficos de la **Figura 42**, se utilizó el siguiente código de colores: tratamiento con AI-10-104 (barra borde celeste, azul o rojo; dependiendo de la dosis y sin relleno, doxorrubicina (**d**) (barra naranja llena, paclitaxel (**PX**) (barra violeta llena) y las combinaciones de inhibidor y droga tienen el relleno del color de la droga y el borde del color de la dosis de AI-10-104. En las combinaciones de tratamientos (+) la nomenclatura de la concentración de drogas utilizada son dos números: el primero corresponde a la dosis del AI-10-104 (**104**) y el segundo corresponde a la dosis de doxorrubicina (**d**) o paclitaxel (**PX**).

#### a- MDA-MB-468



#### b- MDA-MB-231



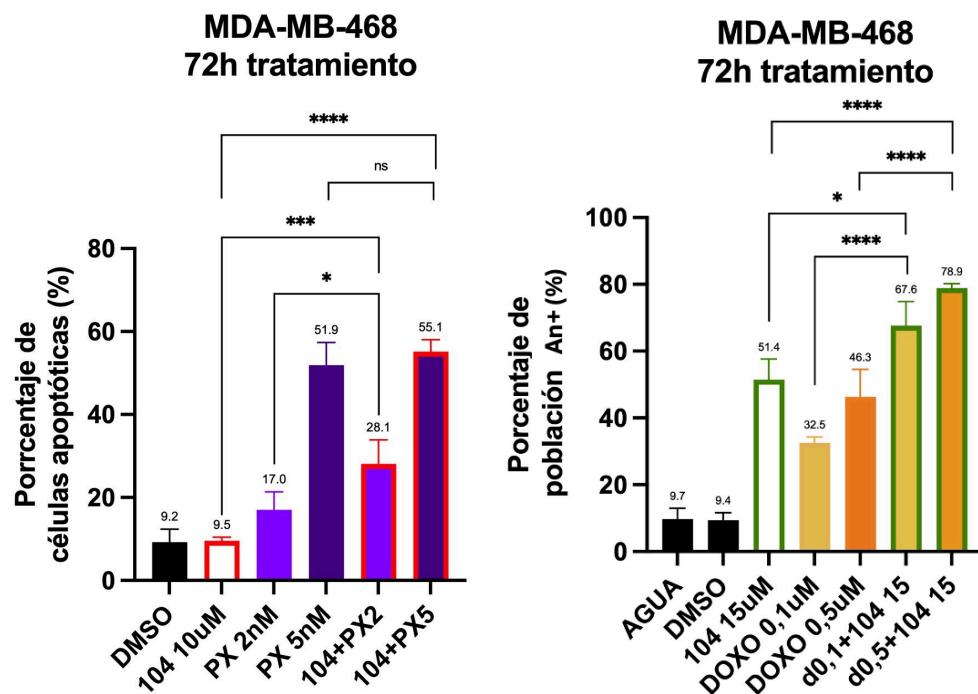
**Figura 42.** Porcentaje de células viables en función de los tratamientos con vehículo (VEH), con AI-10-104 (**104**), con paclitaxel (**PX**) o doxorubicina (**d**), o con la combinación de 104 con PX o d, en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 tras 72 horas de tratamiento, calculado a partir de ensayos de cristal violeta. Los valores son relativos al tratamiento con el vehículo correspondiente. Se consideró 100% a las células tratadas con el vehículo. Se graficó la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada tratamiento. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . En las combinaciones, la nomenclatura utilizada son dos números, el primero corresponde a la dosis del AI-10-104 (104) y el segundo corresponde a la dosis de doxorubicina (**d**) o paclitaxel (**PX**).

En ambas líneas celulares se observó el mismo fenómeno: las células tratadas con la combinación de drogas (**d o PX y AI-10-04**) disminuyó significativamente su viabilidad

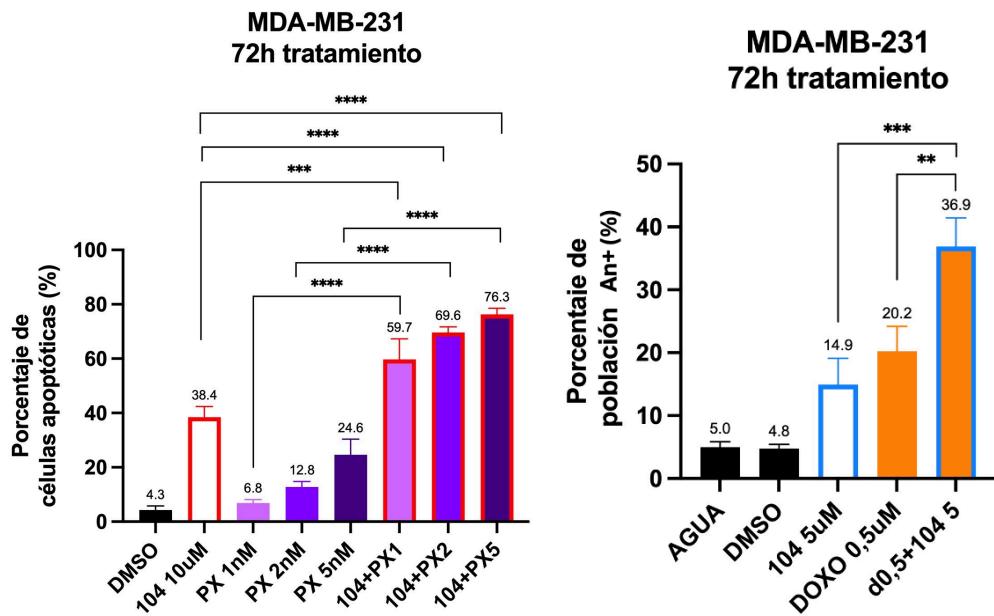
celular (barras con colores combinados) con respecto a cada tratamiento por separado (barra vacía o barra naranja/violeta). Estos resultados sugieren que el tratamiento con drogas quimioterapéuticas sumado a la pérdida de actividad transcripcional de RUNX reduce la sobrevida de las células tumorales significativamente en mayor medida que cada una por separado, haciéndolas más sensibles a la droga quimioterapéutica.

A continuación realizamos ensayos de apoptosis evaluando las cuatro subpoblaciones que mencionamos previamente:  $\text{An}^- \text{IP}^-$  (células vivas),  $\text{An}^+ \text{IP}^-$  (apoptosis temprana),  $\text{An}^+ \text{IP}^+$  (apoptosis tardía) y  $\text{An}^- \text{IP}^+$  (necrosis) para el caso de los experimentos con paclitaxel y la subpoblación  $\text{An}^+$  (apoptosis temprana + apoptosis tardía) para los experimentos con doxorrubicina. Graficamos el porcentaje perteneciente a apoptosis temprana + apoptosis tardía para cada experimento en la **Figura 43**. En este caso, al utilizar más de una dosis de cada droga, se utilizaron tonos más oscuros o más claros de naranja (por doxorrubicina) y de violeta (por PX) según la concentración (a mayor concentración, más oscuro el color).

#### a- MDA-MB-468



#### b- MDA-MB-231



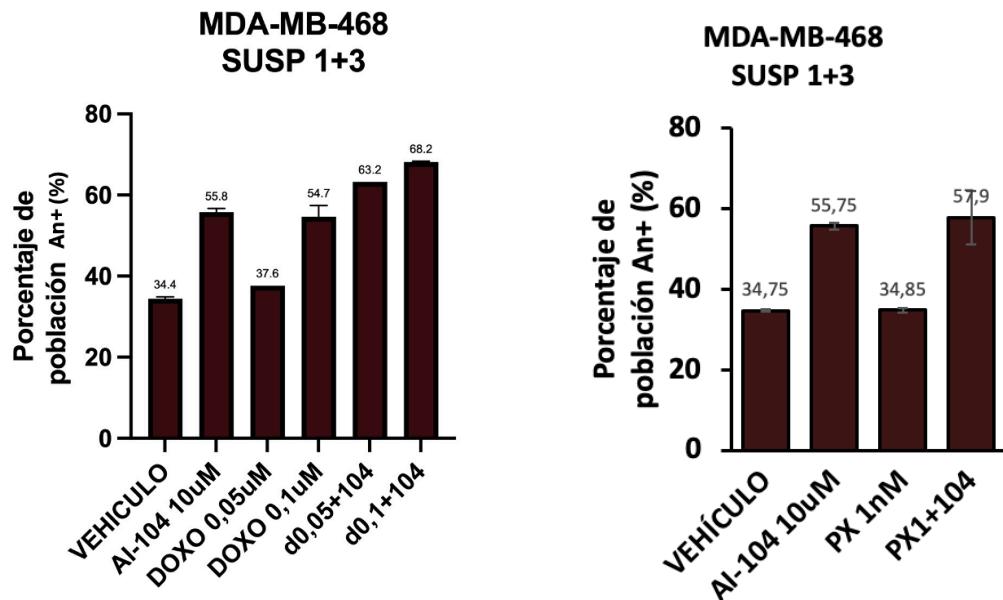
**Figura 43.** Porcentaje de células apoptóticas o IP<sup>+</sup> cultivadas en condiciones estándar (adheridas) y tratadas con AI-10-104 (104) y/o doxorrbicina (DOXO o d) o paclitaxel (PX) en a-MDA-MB-468 y en b- MDA-MB-231 tras 72h de tratamiento. Se graficó la media ± ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada tratamiento. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y \*\*\*\*p < 0.0001.

Tanto en las células MDA-MB-231 como en las MDA-MB-468 se observa un aumento significativo de los niveles de apoptosis al combinar AI-10-104 con DOXO o PX (barras combinadas versus barras de un solo color o solo borde), siendo ésto consistente con el resultado de la **Figura 42**: las células son más sensibles a la droga quimioterapéutica al tener inhibida la actividad transcripcional de RUNX induciendo mayores niveles de apoptosis.

En línea con el concepto de evaluar heterogeneidad intratumoral evaluamos la inducción de apoptosis en el modelo de células suspendidas que simulan las células circulantes del tumor. Como mencionamos en introducción, estas células tienen mucha relevancia en la búsqueda de terapias efectivas ya que suelen permanecer sin ser detectadas por las evaluaciones patológicas estándar y las tecnologías de diagnóstico por imagen (Rushton, A.J. et al., 2021). Asimismo, la presencia de CTCs está asociada con una menor supervivencia global (OS) y una menor supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con TNBC avanzado (Lisencu et al., 2022).

En la **Figura 44**, se observa que, a diferencia de las células cultivadas en adhesión, aquellas crecidas en suspensión forzada no muestran variaciones significativas en los niveles de apoptosis entre la combinación de tratamientos y los tratamientos individuales con las dosis/tiempos empleados. Debido al bajo número de réplicas experimentales no podemos

hacer estadística de los datos sin embargo podemos ya detectar que AI-10-104 casi duplica la apoptosis con respecto al vehículo. Es posible que aumentando el número de experimentos detectemos una diferencia significativa en el tratamiento con doxorrubicina.

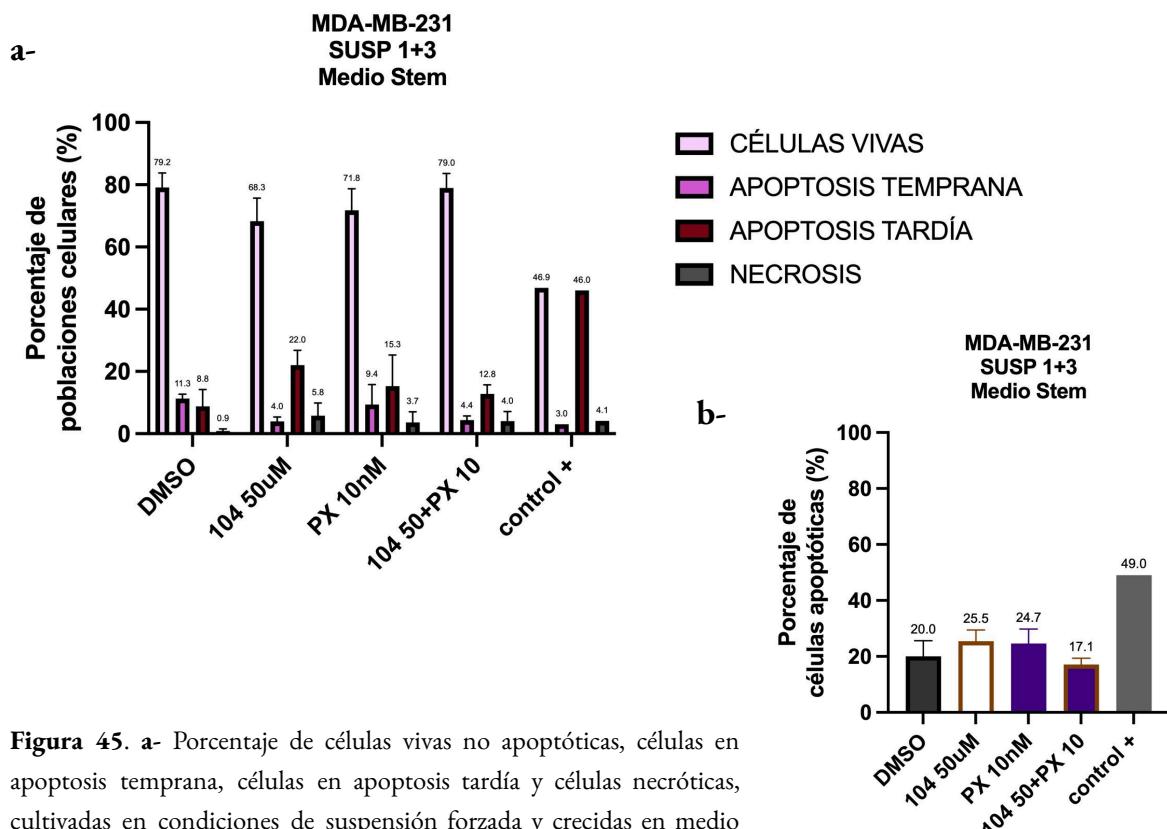


**Figura 44.** Porcentaje de células An+ cultivadas en condiciones de suspensión forzada y tratadas con AI-10-104 y/o doxorrubicina (DOXO) o paclitaxel (PX) en la línea MDA-MB-468 tras 3 días de tratamiento. Se graficó la media  $\pm$  ES ( $n=2$ ).

Algo interesante que se desprende de este experimento es que los niveles de apoptosis medidos en la combinación de tratamientos no resulta ni siquiera cerca de la suma de los niveles de apoptosis de los tratamientos por separado. Esto nos sugiere que en la estrategia de crecimiento forzado las células que sobreviven son heterogéneas en términos de respuesta al inhibidor de RUNX y a Doxo o PX. Este punto es importante para tener en cuenta en las conclusiones de nuestro modelo experimental y en los experimentos próximos del laboratorio. Un efecto similar se observa en trabajos de nuestra colaboradora en donde el modelo de células suspendidas utilizando la línea MDA-MB-453 genera células con alta expresión de RA y otras con baja expresión de RA (Barton 2018).

Como se observa en la **Figura 23**, las células MDA-MB-231 presentan una baja supervivencia en condiciones de suspensión forzada cuando se cultivan en medio de cultivo estándar. Por ello, se evaluó su crecimiento en medio *stem*, el mismo utilizado para favorecer la formación de mamósferas. Al analizar el porcentaje de apoptosis en las cuatro subpoblaciones previamente estudiadas, se observó una supervivencia prácticamente total

de las células. Ni el tratamiento con AI-10-104, ni con PX, ni su combinación, indujeron muerte celular (**Figura 45**).



**Figura 45.** a- Porcentaje de células vivas no apoptóticas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas, cultivadas en condiciones de suspensión forzada y crecidas en medio *stem* para cada tratamiento. b- Porcentaje de células apoptóticas (apoptosis temprana + apoptosis tardía) para cada tratamiento. Como control positivo se usaron células MDA-MB-468 tratadas con AI-10-104 20 uM que, como muestra la Figura 8B, sufren apoptosis. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=2).

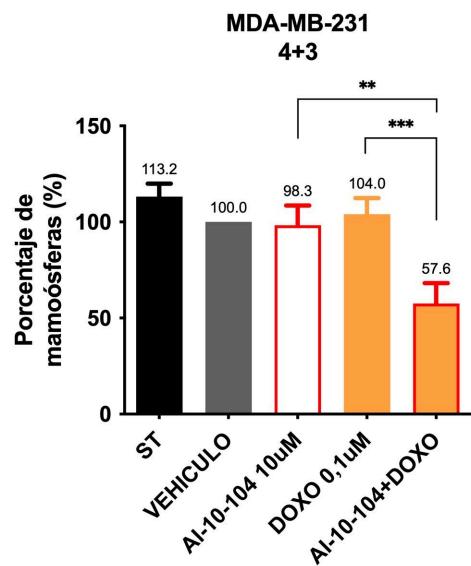
Estos datos sugieren que el fenotipo *stem-like* adquirido por las células en suspensión con medio rico-*stem* le otorga otras ventajas de supervivencia que les permiten resistir a la quimioterapia y al inhibidor AI-10-104, a diferencia de la toxicidad observada en las células creciendo en forma adherida.

En conclusión, en ambas poblaciones en suspensión (MDA-MB-468 con medio de cultivo estándar y MDA-MB-231 con medio de cultivo *stem*) la pérdida de función de RUNX no incrementa la sensibilidad a drogas como sí ocurre en las células creciendo en adherencia. Es posible que sea necesario un aumento de dosis y/o tiempos para observar un efecto tóxico favorable.

A continuación estudiamos la sensibilidad de las células a doxorrubicina en el modelo de células creciendo como mamósferas. Los esferoides se consideran uno de los criterios para

confirmar la presencia de CSCs (Ponomarev, A.S. et al., 2023). Las CSCs son particularmente resistentes a las terapias convencionales de quimioterapia y radioterapia en comparación con las células más diferenciadas no-CSC mediante diversos mecanismos (**ver Figura 4 en Introducción**). El desarrollo de modelos de cultivo celular en 3D permite replicar con mayor precisión varias de las características biológicas y moleculares de los tumores *in vivo*. El aumento de los contactos célula-célula y célula-matriz en esferoides compactos no solo modifica la resistencia al tratamiento antineoplásico (proporcionando una respuesta a fármacos más fisiológica), sino que también limita la difusión de nutrientes y oxígeno, favoreciendo el desarrollo de un microambiente hipoxico (Salinas-Vera et al, 2022). Además, la restricción en la difusión de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento genera un gradiente de concentración de factores biológicos similar al de las células tumorales en regiones no vascularizadas. Esto da lugar a una composición más estratificada, donde la periferia del esferoide está formada por células proliferativas, la zona intermedia contiene células en estado quiescente y el centro del esferoide presenta células necróticas (Salinas-Vera et al, 2022).

Se cultivaron las MDA-MB-231 en el medio *stem*, que en nuestras manos es la línea celular que mejor responde a este medio de cultivo para generar esferas, en placas no adherentes como está descrito en **Materiales y Métodos - Generación de mamósferas**. Se esperaron cuatro días para favorecer la generación de dichas mamósferas y, una vez formadas, se las trató con doxorrubicina, con AI-10-104 o ambas. A los tres días de tratamiento, se contaron mamosferas por microscopio óptico.



**Figura 46.** Porcentaje de mamósferas que “sobrevivieron” al tratamiento con vehículo, con AI-10-104, con doxorrubicina (DOXO), y con ambos; con respecto al tratamiento con vehículo sólo. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=4). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de cada tratamiento. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

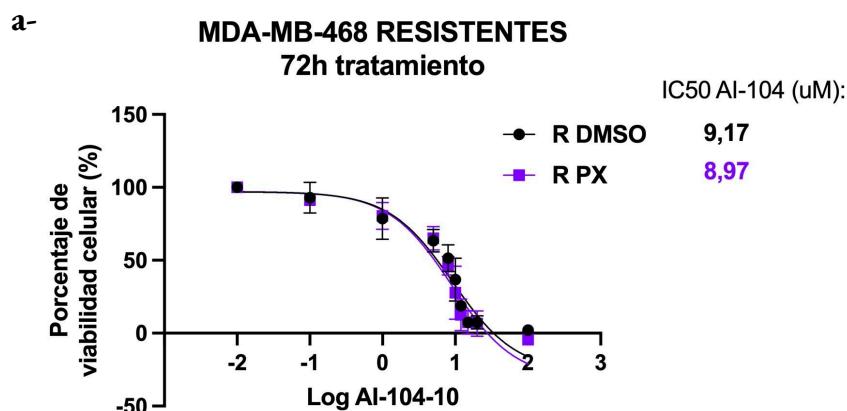
4+3: 4 días de generación de esferas, 3 días de tratamiento.  
Aclaración: este experimento se realizó con las MDA-MB-231 del laboratorio de Roxana Schillaci, presentando un IC50=15uM para AI-10-104.

Como se observa en la **Figura 46**, la combinación de tratamiento generó un efecto tóxico en las mamosferas, determinado por una disminución significativa del número de mamosferas

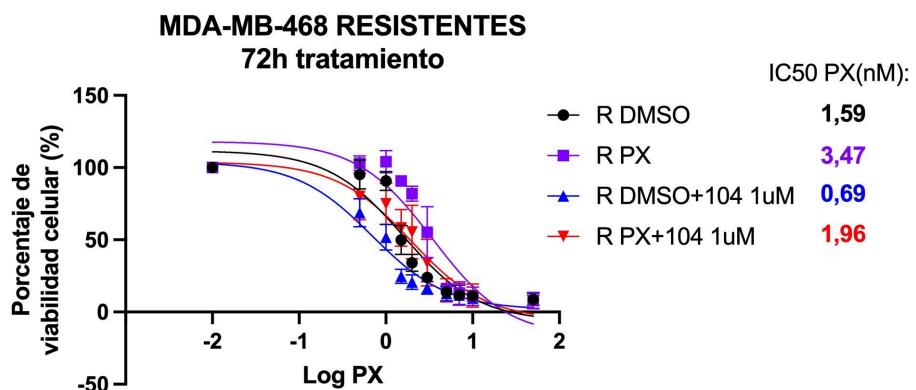
(barra naranja con borde rojo), mientras que no hubo efecto tóxico en las mamósferas cultivadas con los tratamientos por separado.

En este punto, es importante aclarar que tanto el AI-10-104 como la doxorrubicina parecen no tener efecto por sí solos en la supervivencia de las mamósferas, esto podría deberse a la restricción en la difusión de drogas debido a la estructura 3D de las esferas y su característica resistencia a drogas. No obstante, la combinación de fármacos disminuye significativamente el número de mamósferas evidenciando que la combinación de alteración de procesos biológicos puede eliminar esta subpoblación responsable de generar metástasis *in vivo*. A diferencia de las CTCs, las células que componen las mamósferas con fuerte fenotipo *stem recién* son sensibles a la doxorrubicina cuando pierden la actividad transcripcional de RUNX.

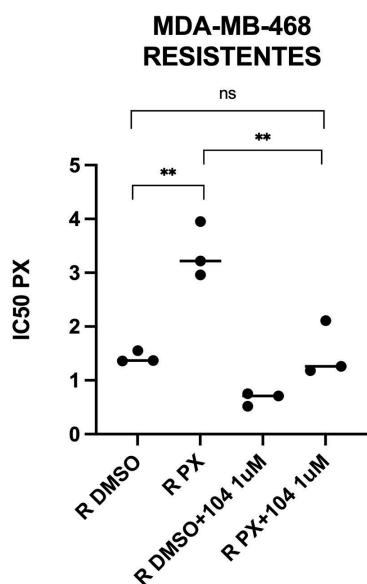
Por último, se buscó determinar si la inhibición simultánea de la actividad transcripcional de RUNX podría restablecer la sensibilidad al PX en las células MDA-MB-468 resistentes a este fármaco. Cabe recordar que la resistencia a PX se generó mediante un tratamiento continuo con la droga hasta alcanzar un valor de IC<sub>50</sub> significativamente superior al de la población control, la cual fue tratada con DMSO, el vehículo de paclitaxel. A continuación ambas poblaciones celulares (control o R-DMSO y resistentes o R-PX) fueron expuestas a concentraciones crecientes de paclitaxel, en presencia o ausencia de AI-10-104 (1  $\mu$ M) durante 72 horas, con el fin de evaluar posibles modificaciones en el IC<sub>50</sub> de PX (**Figura 47b**). Se seleccionó una dosis de AI-10-104 de 1  $\mu$ M por ser lo suficientemente baja como para no inducir apoptosis por sí sola, permitiendo así una ventana de oportunidad adecuada para calcular el IC<sub>50</sub> de PX mayoritariamente.



b-



c-



**Figura 47.** a- Curvas de porcentaje de células viables en función del logaritmo de la concentración de paclitaxel (PX) para las dos poblaciones celulares (MDA-MB-468 R DMSO= control y R PX=resistentes) tratadas con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104). La tinción de viables es con cristal violeta. b- Valores de IC50 de cada población celular y cada tratamiento. Se graficó la media  $\pm$  ES ( $n=4$ ) y se realizó un t test, \*  $p < 0.01$ . c- Curvas de porcentaje de células viables en función del logaritmo de la concentración de AI-10-104 para R DMSO y R PX mediante ensayos de cristal violeta.

Como se observa en la **Figura 47a**, ambas poblaciones (R-DMSO y R-PX) tienen la misma sensibilidad al inhibidor AI-10-104, indicando que la generación de resistencia a PX no dio lugar a una resistencia paralela a AI-10-104, como podría haber ocurrido por el fenómeno de resistencia cruzada (Duan, Z. et al, 2009; Nana Ji et al., 2010; H. Thomas et al., 2003; W. Li, et al., 2016; Tegze B et al., 2012). Esto es muy útil para la práctica clínica ya que se puede usar la combinación de drogas, cuando una de ellas genera resistencia.

Asimismo, en la **Figura 47b** podemos observar que la población resistente a PX (R-PX) “recupera” la sensibilidad a esta droga al inhibir simultáneamente la actividad transcripcional de RUNX. Esto se puede ver más claramente en la **Figura 47c**: Por un lado, la población resistente tratada con AI-10-104 (R PX+ 104 1uM) alcanza un valor de IC50 muy similar a la población control sin AI-10-104 (R DMSO). Por otro lado, el valor IC50

de la población resistente con AI-10-104 (R PX+ 104 1uM) disminuye significativamente con respecto al de la población resistente sin AI-10-104 (R PX).

Esto quiere decir que inhibir la actividad transcripcional de RUNX en la población resistente a PX la convierte en una población más sensible a dicha droga, ya que disminuye su resistencia a PX a tal punto que alcanza un IC50 a PX similar al de la población control.

### **Conclusiones del objetivo 2:**

- El tratamiento con doxorrubicina y paclitaxel aumenta la expresión del mRNA de *RUNX1* en las MDA-MB-231 y MDA-MB-468 respectivamente.
- El tratamiento con doxorrubicina y paclitaxel aumentan la expresión del mRNA de *GJA1* (marcador de metástasis) en las MDA-MB-231 y de *KLF4* (marcador *stem*) en ambas líneas.
- La población celular resistente a paclitaxel expresa mayores niveles de la proteína RUNX1 en comparación con la población celular control (DMSO).
- Las células MDA-MB-231 transfectadas con el plásmido que contiene la versión dominante negativa de *RUNX1* y tratadas con doxorrubicina tienen menor viabilidad celular que con los dos tratamientos por separado.
- El tratamiento con AI-10-104 y con doxorrubicina o paclitaxel disminuye significativamente la viabilidad celular con respecto a los tratamientos por separado en ambas líneas celulares.
- El tratamiento con AI-10-104 y con doxorrubicina o paclitaxel aumenta significativamente la apoptosis con respecto a los tratamientos por separado en ambas líneas celulares en condiciones estándar de adherencia.
- El tratamiento con AI-10-104 y con doxorrubicina no induce niveles significativos de apoptosis con respecto a los tratamientos por separado en ambas líneas celulares en condiciones de suspensión forzada. Pero en MDA-MB-468 en esta condición de suspensión hay una tendencia a morirse bajo el tratamiento con AI-10-104 (alrededor del 60%) aunque no aumente con doxorrubicina o paclitaxel.
- El tratamiento con AI-10-104 y con doxorrubicina disminuye significativamente el número de mamósferas con respecto a los tratamientos por separado en las MDA-MB-231.
- Las células resistentes a paclitaxel tratadas con una baja dosis de AI-10-104 recuperan la sensibilidad a paclitaxel.

Estos resultados, en su conjunto, sugieren que RUNX desempeña un rol relevante en la biología de respuesta de las líneas celulares TNBC a los fármacos quimioterapéuticos, doxorrubicina y PX. Por un lado, su expresión se incrementa tras el tratamiento con doxorrubicina y PX, y se observa una mayor expresión en las células resistentes a PX. Por otro lado, la inhibición de su actividad transcripcional sensibiliza a las células a estas drogas, tanto en células adherentes como en mamósferas y en células resistentes a PX. No obstante, este efecto no se manifiesta en el modelo que simula las células tumorales circulantes, lo que indica que la inhibición de RUNX en este contexto debemos seguir explorando otras formas de combinación o explorar otros mediadores de resistencia.

Los datos recolectados en este objetivo revelan que estudiar la participación de un factor de transcripción en diferentes subpoblaciones del tumor puede darnos información fundamental compartimentalizada para comprender cómo diseñar una droga y donde puede fallar. Además nuestros datos sostienen el concepto que indica que un tratamiento iniciado en estadios tempranos de la enfermedad favorece el éxito de la terapia.

De esta manera, la reducción de su actividad transcripcional *in vivo* podría representar un potencial blanco terapéutico para el tratamiento del TNBC.

### Objetivo 3:

#### Investigar los posibles mecanismos involucrados en la modulación de la sensibilidad a drogas mediada por RUNX.

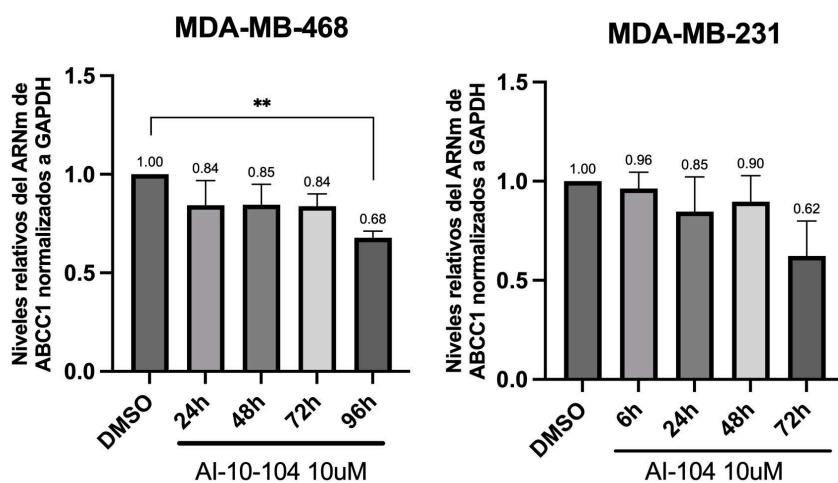
Como mencionamos en la introducción, la sobreexpresión y activación preferencial de las proteínas transportadoras ABC se considera una de las principales causas de quimiorresistencia en **CSCs** (Begicevic and Falasca, 2017; Wang et al., 2021). Estos transportadores transportan y excretan una variedad de sustancias, incluyendo metabolitos, fármacos, sustancias tóxicas, lípidos, péptidos y esteroides. Se consideran una bomba de desintoxicación, que afecta la farmacocinética y la eficacia terapéutica debido a su capacidad para facilitar la excreción de agentes quimioterapéuticos por múltiples vías, reduciendo significativamente la efectividad de los fármacos quimioterapéuticos que originalmente tenían una actividad inhibitoria o citotóxica sobre las células cancerosas, incluyendo las CSCs. Las proteínas transportadoras ABC protegen a las CSCs de los efectos letales de los fármacos, lo que conduce al fenómeno de resistencia primaria a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés *MultiDrug Resistance*) en células tumorales frente a los tratamientos quimioterapéuticos (McIntosh, K. et al., 2016; Tufail M. et al., 2024).

Además, informes recientes de Gazzaniga et al. han demostrado que las **CTCs** de pacientes con cáncer de mama metastásico expresan proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRPs, por sus siglas en inglés *Multi Resistant Proteins*) (Gazzaniga P. et al., 2010; Gradilone A. et al., 2011; Abdallah et al., 2016). Los pacientes con CTCs MRP-positivas presentan intervalos de progresión libre de enfermedad significativamente más cortos que los MRP-negativos (Gradilone, A. et al., 2011; Abdallah et al., 2016).

En células de glioblastoma se ha demostrado que el eje RUNX1/miR-128-3p regula la expresión de ABCC1 (Jianglong Xu et al., 2021). Además, se ha reportado que RUNX1 promueve la expresión de ABCG2 en células de cáncer colorrectal (Qingyuan Li et al., 2021).

Para poder estudiar los transportadores ABC en el laboratorio contamos con los *primers* para determinar la expresión de los mRNAs de *ABCG2*, *Pgp* y *ABCC1*; y los anticuerpos para evaluar la expresión de las proteínas ABCG2 y Pgp.

En primer lugar, tratamos a ambas líneas celulares con AI-10-104 durante distintos tiempos y medimos la expresión del mRNA de *ABCC1*.

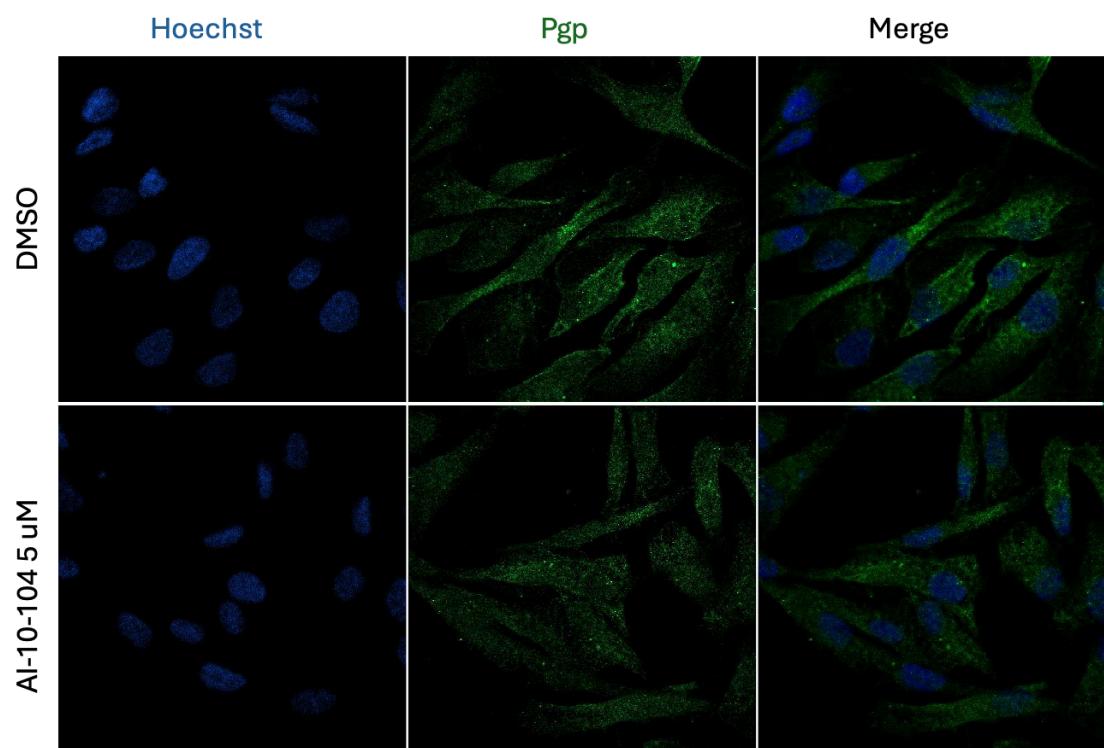


**Figura 48.** Expresión relativa del ARNm de *ABCC1* medido por qPCR en MDA-MB-231 y MDA-MB-468 adheridas tratadas con AI-10-104 (10 uM) a distintos tiempos. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con DMSO. Se graficó la media de las veces de cambio  $\pm$  ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para evaluar el efecto de AI-10-104.

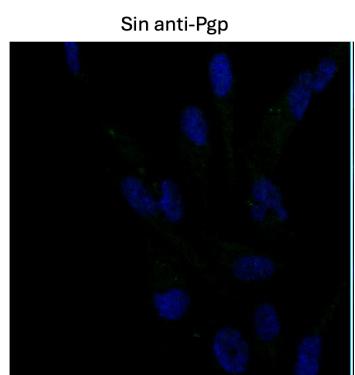
En el modelo de células crecidas en condiciones estándar (adheridas), la expresión de *ABCC1* disminuye un 30% aproximadamente a las 96 horas en la línea MDA-MB-468 pero no se modifica en las MDA-MB-231 (**Figura 48**). Este resultado indica que, al menos en las células MDA-MB-468, RUNX podría estar regulando la expresión de este gen.

Con el fin de conocer si los transportadores cambian su localización subcelular o modifican su expresión ante la ausencia de la actividad transcripcional de RUNX, se trató a las células con AI-10-104 durante 72 horas y se realizó una inmunofluorescencia según lo descrito en **Materiales y Métodos - Inmunofluorescencia**. Se utilizó el anticuerpo específico contra Pgp y Hoechst para marcar los núcleos.

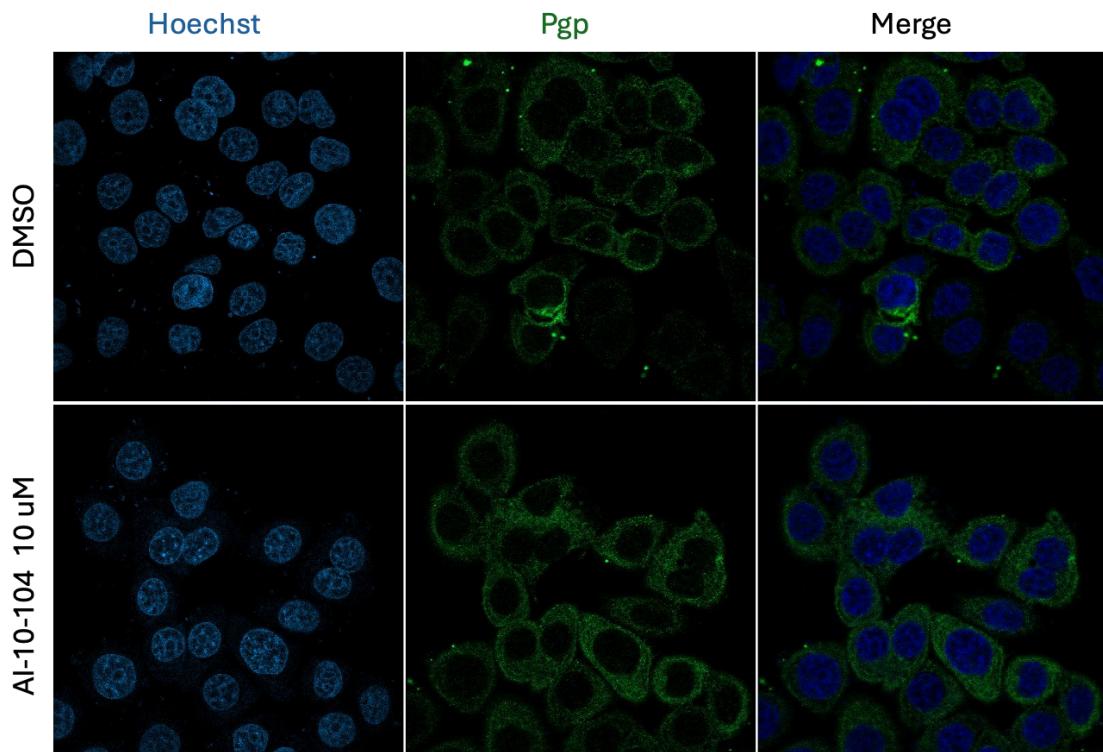
#### a- MDA-MB-231



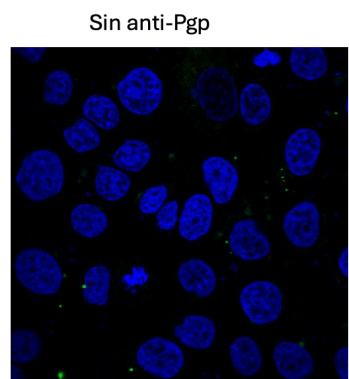
**b-**



**c- MDA-MB-468**



d-



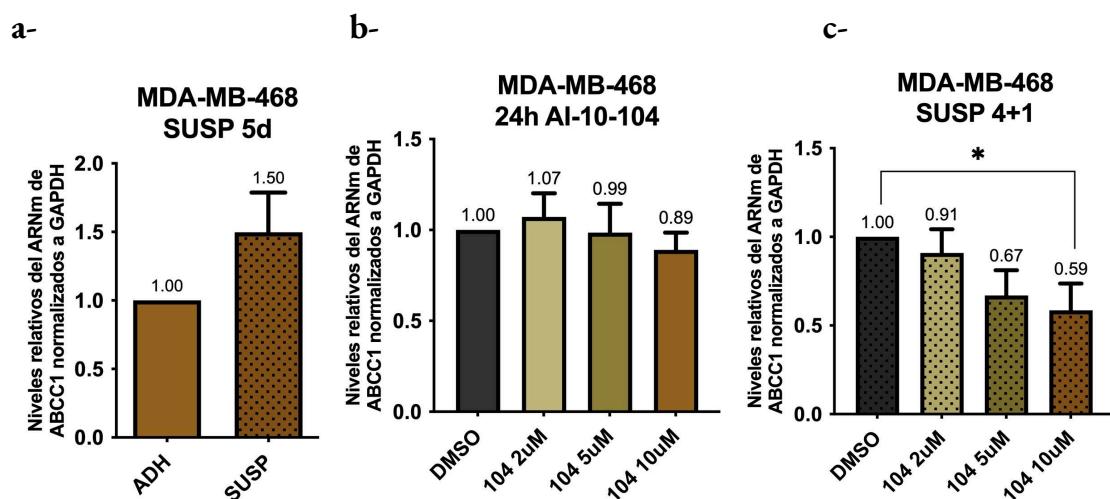
**Figura 49.** Expresión proteica de PGP evaluada por inmunofluorescencia en las líneas MDA-MB-231 (**a** y **b**) y MDA-MB-468 (**c** y **d**). Se muestra un campo representativo con PGP en verde y HOECHST en azul. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM980 con aumento 63x. **a**- MDA-MB-231, arriba: campo representativo del tratamiento con vehículo (DMSO), abajo: campo representativo del tratamiento con AI-10-104 5 uM. **b**- Control de fluorescencia: MDA-MB-231 sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario (Alexa 488). **c**- MDA-MB-468, arriba: distintos campos del tratamiento con vehículo (DMSO), abajo: campo representativo del tratamiento con AI-10-104 10 uM. **d**- Control de fluorescencia: MDA-MB-468 sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario (Alexa 488).

Como se observa en la **Figura 49**, la localización del transportador Pgp es citoplasmática en todos los casos, sin que se evidencian cambios significativos ni en su expresión ni en su localización entre el tratamiento con el inhibidor o su control tratado con el vehículo en ninguna de las dos líneas celulares analizadas. Estos resultados indican que RUNX no ejerce actividad regulatoria sobre el transportador Pgp en estas líneas celulares TNBC.

Es probable que la expresión de los transportadores esté aumentada en células *stem* y/o en células resistentes. En el caso de las células *stem* normales, ha sido reportado que éstas

emplean transportadores ABC para detoxificarse y así protegen biológicamente el *pool* celular del tejido que mantienen; las CSC parecen emplear los mismos mecanismos contra las terapias anticancerígenas (Dallas, N.A. et al., 2009). En el caso de las células resistentes a una droga, lo que justamente disminuye la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos es la excreción de dichas drogas debido al aumento en la expresión de los transportadores ABC (Błauż A, Rychlik B., 2016).

Por lo tanto se evaluó la expresión de ARNm de *ABCC1* en las células MDA-MB-468 crecidas en suspensión (con fenotipo *stem*) comparándolas con la expresión en células adheridas. Para ello, se permitió que las células permanecieran en cultivo durante cuatro días, con el fin de favorecer el aumento en la expresión de genes *stem*. Posteriormente, ambas poblaciones celulares (adheridas y suspendidas) fueron tratadas con AI-10-104 durante 24 horas. Finalmente, se procedió a la extracción de RNA, seguida de la RT y qPCR para analizar la expresión génica.

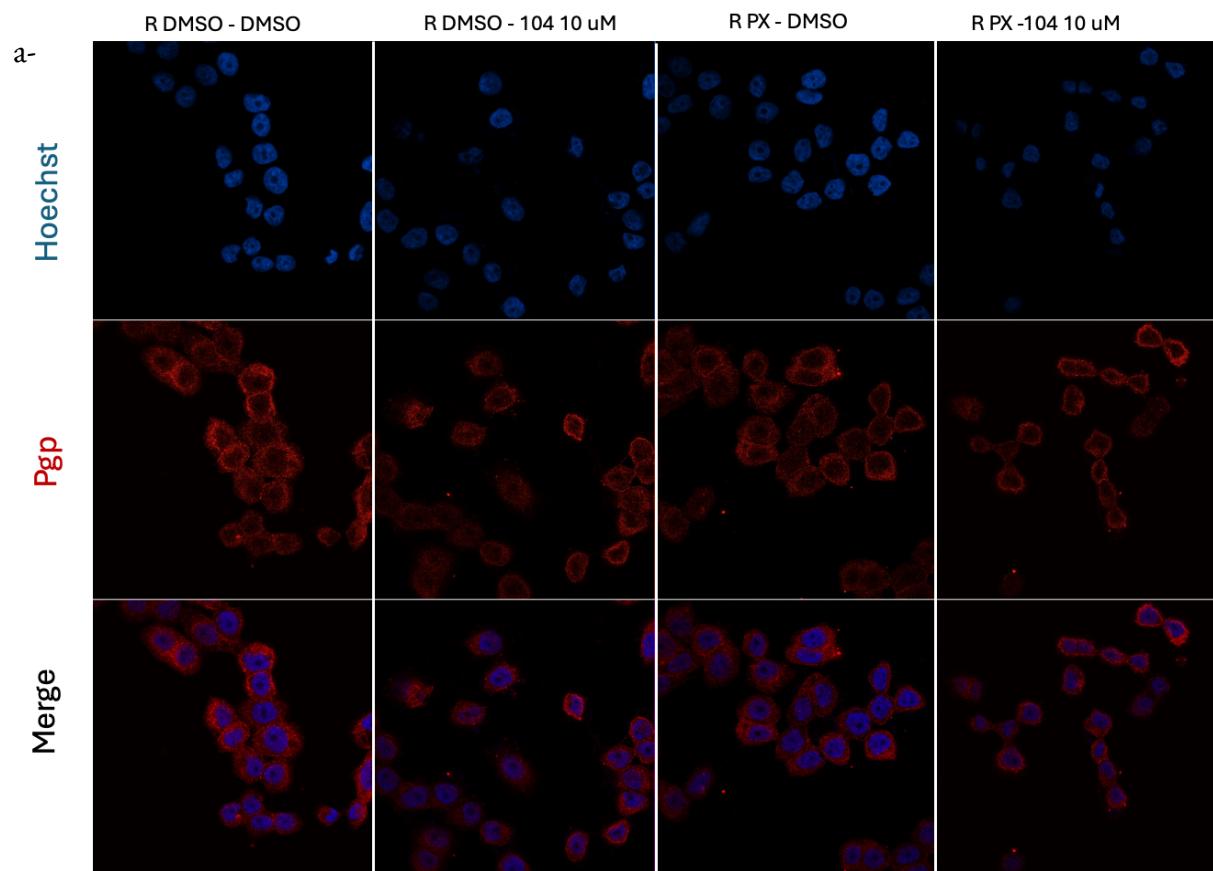


**Figura 50.** Expresión relativa del ARNm de *ABCC1* medida por qPCR en las MDA-MB-468 **a-** comparando la población de células adheridas con la de células suspendidas. **b-** MDA-MB-468 adheridas tratadas con distintas dosis de AI-10-104 (104) por 24 horas. **c-** MDA-MB-468 suspendidas tratadas con distintas dosis de AI-10-104 (104) por 24 horas luego de 4 días de mantenerlas en suspensión para que se expresaran los genes *stem*. Los valores están normalizados a la expresión de *GAPDH* de cada muestra y relativos a la expresión de este gen en las células tratadas con DMSO. Se graficó la media de las veces de cambio  $\pm$  ES (n=3). Se realizó prueba de t en a- y One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák para b- y c-.

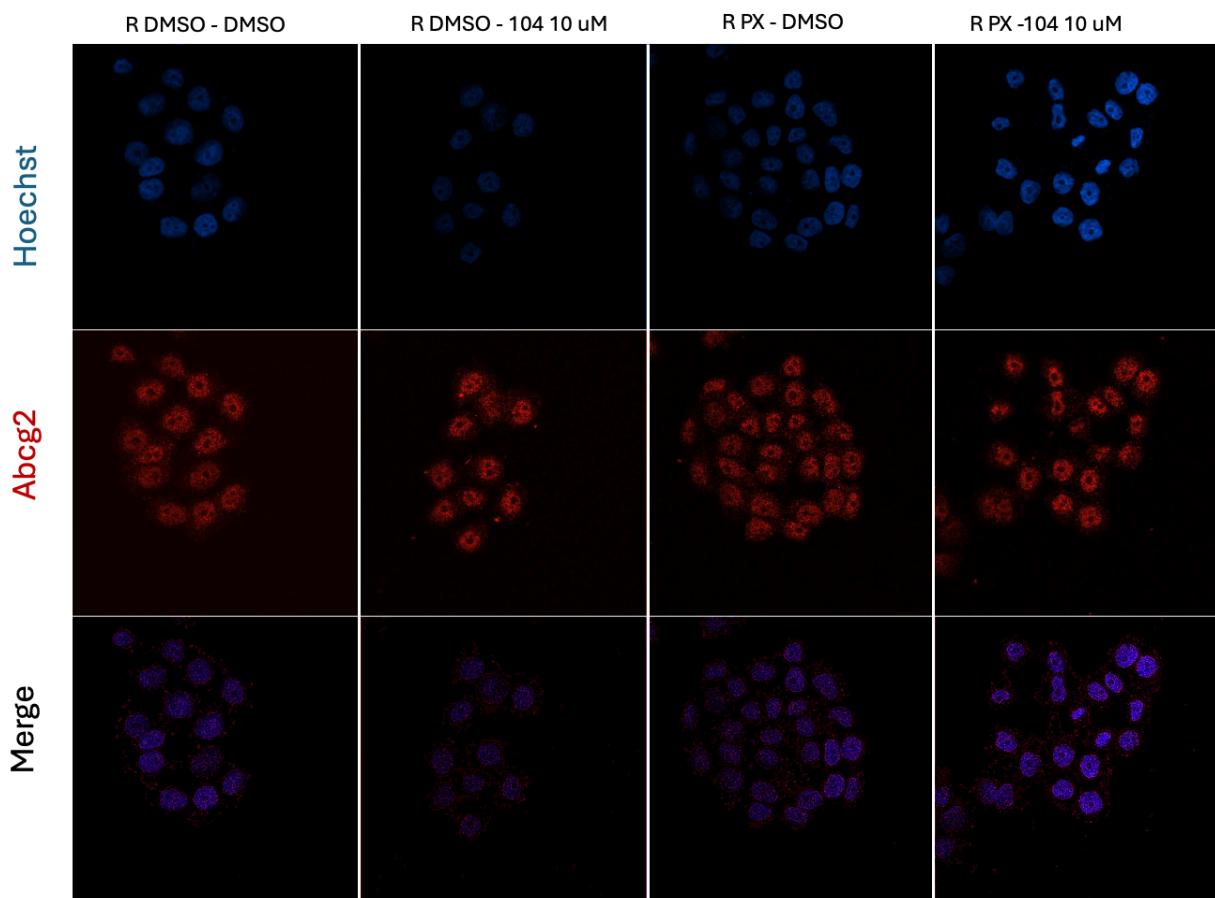
Como se observa en la **Figura 50a**, la expresión de *ABCC1* aumenta en la población suspendida comparada con la adherida, validando nuevamente que esta subpoblación tiene un perfil *stem*. Asimismo, en la población adherida no se modifica la expresión de *ABCC1* luego del tratamiento con AI-10-104, mientras que en la suspendida los niveles de mRNA

disminuyen significativamente con AI-10-104. Estos resultados sugieren que RUNX regularía la expresión de este transportador en las células MDA-MB-468. Este transportador podría ser el responsable de otorgar mayor resistencia en la línea MDA-MB-468 a paclitaxel. Por esta razón, inhibir la actividad transcripcional de RUNX en las células resistentes a PX podría permitir un mejor efecto tóxico de las drogas quimioterapéuticas debido a una menor excreción de las mismas.

A continuación, volvimos a estudiar la localización subcelular de Pgp y ABCG2 pero ahora en las MDA-MB-468 resistentes a PX mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se trataron ambos grupos, línea R DMSO (control) y la línea R PX (resistente a PX), con vehículo (DMSO) o con AI-10-104 (104; 10 uM) por 72 horas.



b-



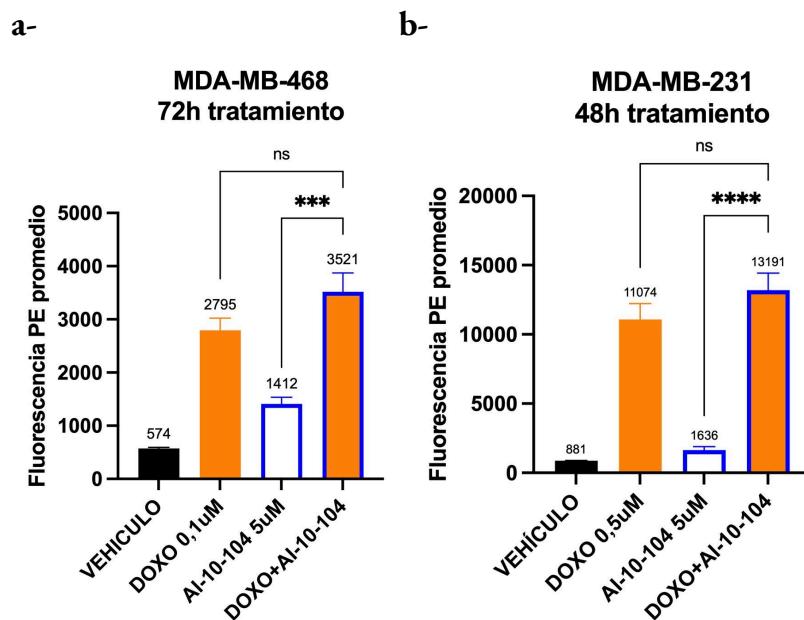
**Figura 51.** Expresión proteica de **a**- Pgp y **b**- ABCG2 evaluada por inmunofluorescencia en la líneas MDA-MB-468 control (dos primeras filas) y resistente (tercera y cuarta filas) tratadas con vehículo (primera y tercera fila) o con AI-10-104 10uM (segunda y cuarta fila). Se muestran campos representativos con dichas proteínas en rojo. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Zeiss LSM980 con aumento 63x.

Como se observa en la **Figura 51**, no detectamos diferencias de expresión o localización de Pgp ni ABCG2 entre una población y otra, ni entre los tratamientos. Esto nos sugiere que inhibir la actividad transcripcional de RUNX no tiene ningún efecto sobre la expresión ni localización de los transportadores ABCG2 y Pgp.

Dado que la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX reduce la expresión del mRNA de *ABCC1* y aumenta la sensibilidad a doxorrubicina, nos preguntamos si la acumulación intracelular de doxorrubicina se vería afectada por la modulación de la actividad de RUNX. Para estudiar este fenómeno, hicimos uso de la propiedad de autofluorescencia de esta droga y medimos la intensidad de su fluorescencia en presencia y en ausencia de AI-10-104. La cuantificación se realizó mediante citometría de flujo,

siguiendo el protocolo descrito por Orlando et al. (2019), tal como se detalla en la Sección XIII de Materiales y Métodos. Lo que medimos en el tratamiento con AI-10-104 es autofluorescencia.

Como se puede observar en la **Figura 52**, no se detectó un aumento significativo en la acumulación intracelular de doxorrubicina al combinarla con AI-10-104 comparado con los tratamientos por separado.



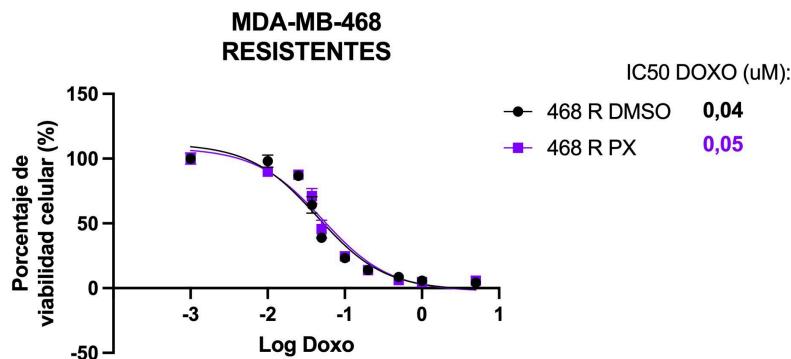
**Figura 52.** Fluorescencia promedio de doxorrubicina medida a través del canal PE **a-** en la línea MDA-MB-468 adheridas en el citómetro de flujo BD FACSAria II y **b-** en la línea MDA-MB-231 adheridas en el citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus, tratadas con vehículo, doxorrubicina (DOXO), AI-10-104 y su combinación. Se graficó la media  $\pm$  ES (n=3). Se realizó One-Way Anova y comparaciones a posteriori de Šidák.

Es decir que RUNX no promovería la salida de doxorrubicina de la célula como esperábamos, al menos con estas dosis, estos tiempos de tratamientos y esta forma de cuantificación.

Este experimento se llevó a cabo utilizando el modelo de células cultivadas en condiciones estándar (adheridas), en el cual se espera que la expresión de los transportadores se mantenga en un nivel “basal”, como se observa en la **Figura 48**.

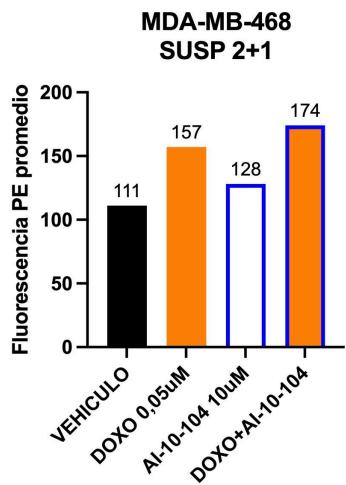
Se ha reportado la existencia del fenómeno de resistencia cruzada (*cross-resistance*) (Duan, Z. et al., 2009; Nana Ji et al., 2010; H. Thomas et al., 2003; W. Li et al., 2016; Tegze B et al., 2012). Por ello, evaluamos si en nuestro modelo de células resistentes a PX se observaba

dicha resistencia frente a la doxorrubicina (además de resistencia a PX). Sin embargo, como podemos observar en la **Figura 53**, las MDA-MB-468 resistentes a PX no son resistentes a la doxorrubicina.



**Figura 53.** Curvas de porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de concentraciones crecientes de doxorrubicina en las líneas MDA-MB-468 control y resistente a PX. Valor de IC50 obtenido a partir de una transformación logarítmica de las concentraciones de doxo y PX y una regresión no lineal en el programa *GraphPad*.

En el modelo de células en suspensión forzada, la expresión de *ABCC1* (**Figura 49**) está ligeramente aumentada con respecto a las adheridas. Sin embargo tampoco observamos diferencias en la acumulación de doxorrubicina en la **Figura 54**.



**Figura 54.** Fluorescencia promedio de doxorrubicina medida a través del canal PE en las MDA-MB-468 suspendidas (n=1) en el citómetro de flujo BD FACS Aria II.

Es decir que en ninguno de los dos modelos, adheridas y suspendidas, RUNX ejerce alguna actividad en la salida de doxorrubicina de la célula, en las condiciones evaluadas.

### **Conclusiones del objetivo 3:**

- La expresión del ARNm del transportador *ABCC1* disminuye un 30% a las 96 horas con AI-10-104 (10uM) en las células MDA-MB-468 adheridas, pero no se modifica en las células MDA-MB-231.
- La localización subcelular del transportador Pgp no se modifica con el tratamiento de AI-10-104 ni en las MDA-MB-468 ni en las MDA-MB-231. Presenta localización citoplasmática en todos los casos.
- La expresión del transportador *ABCC1* se encuentra aumentada un 50% en la población suspendida con respecto a la población adherida de las MDA-MB-468. Inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la expresión del mRNA del transportador en la población de células creciendo en suspensión forzada. La recuperación de sensibilidad a PX en esta línea celular al inhibir la actividad transcripcional de RUNX podría ser a través del aumento de la acción de PX por pérdida de ABCC1. La localización subcelular de Pgp y ABCG2 en las poblaciones de células MDA-MB-468 control y resistentes a PX tratadas con AI-10-104 no se modifican con respecto a las tratadas con vehículo.
- La retención de doxorrubicina no sufre modificaciones al inhibir la actividad transcripcional de RUNX en las MDA-MB-231 y MDA-MB-468 adheridas y suspendidas en las condiciones establecidas.

En conclusión, inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la expresión del transportador *ABCC1* en las MDA-MB-468 suspendidas. No se encontraron evidencias de modulación de la expresión o localización de otros transportadores como PGP y ABCG2. Esta evidencia inicial nos indica que la capacidad de RUNX de aumentar la resistencia a drogas y la supervivencia de las distintas subpoblaciones no es a través de la regulación de la expresión de los genes de los transportadores evaluados.

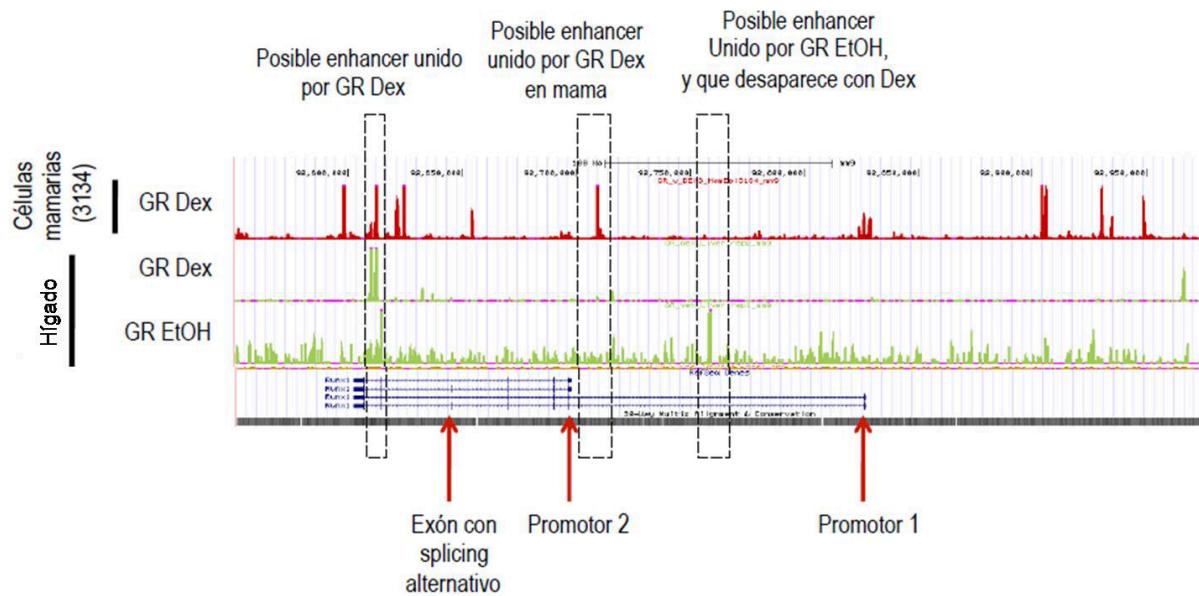
## Objetivo 4:

### Evaluar si el receptor de glucocorticoides (GR) es capaz de regular la expresión de RUNX1.

El receptor de glucocorticoides (GR por sus siglas en inglés *glucocorticoid receptor*) se expresa en el epitelio de la glándula mamaria normal y regula procesos fisiológicos normales del tejido (Bertucci et al., 2010; Hoijman et al., 2012; Noureddine et al., 2021). En la búsqueda de marcadores y blancos terapéuticos para TNBC, este receptor ha sido identificado como marcador de mal pronóstico dado que una alta expresión de GR correlaciona con una reducida sobrevida global y una sobrevida libre de metástasis más corta en pacientes TNBC que han sido tratados con quimioterapia (Chen et al., 2015). También ha sido descrito que el ARNm de GR está sobreexpresado en líneas celulares de TNBC en comparación con otros subtipos (Buschmann, D. et al., 2018).

Un ensayo clínico en fase 1 (NCT01493310) mostró que el GR podría ser un blanco prometedor en TNBC, dado que pacientes TNBC-GR<sup>+</sup> respondieron positivamente a la combinación de antagonistas del GR (mifepristone) y quimioterapia (paclitaxel) (Nanda et al., 2016). La fase II (NCT02788981) reportó que la adición de mifepristone a nab-paclitaxel (nab-Pac) no mejoró significativamente la supervivencia libre de progresión en comparación con nab-Pac solo en pacientes con cáncer de mama metastásico. Sin embargo se observó una tendencia hacia una mayor supervivencia global (Nan Chen et al., 2025).

Un análisis *in silico* realizado en colaboración con el Dr. Rodríguez Seguí y la Dra. Virginia Dansey (IFIBYNE) muestra que el promotor y zonas regulatorias de RUNX1 poseen sitios de potencial regulación mediado por GR.

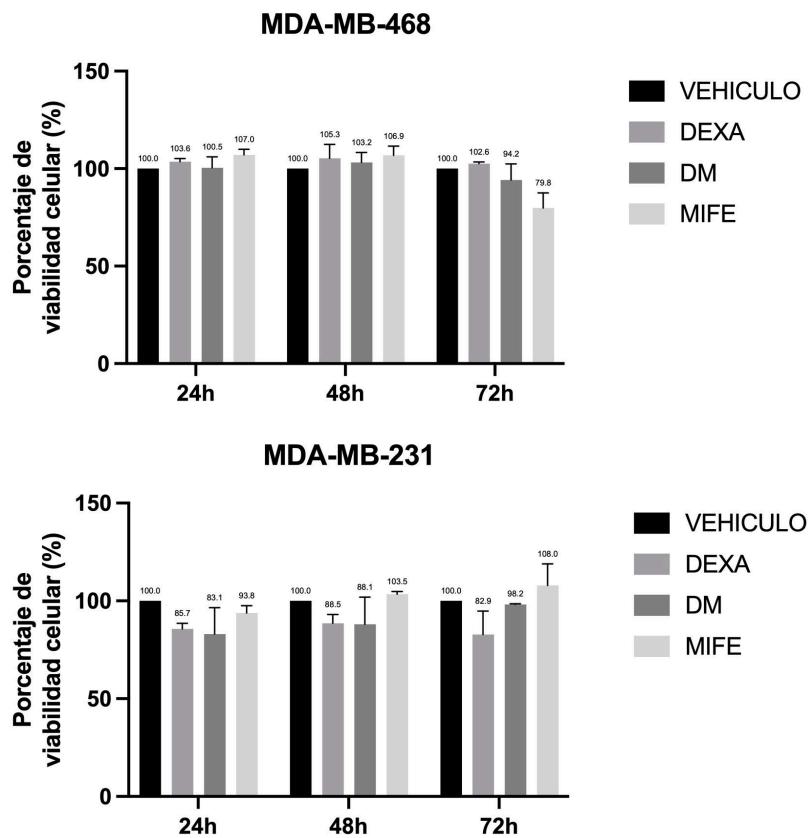


**Figura 55.** Imagen obtenida del UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Abajo: En azul se muestra un esquema del gen Runx1 murino. Arriba: Los picos en color representan la unión del GR en la región promotora 2 y el último intrón del gen de Runx1 en células mamarias y de hígado murino normal. Figura preparada por el Dr. Santiago Rodríguez Seguí.

A partir de esta información nos resultó interesante estudiar al GR como un mecanismo para regular la expresión celular de RUNX1 externamente.

Según la bibliografía consultada, la dosis de dexametasona y del antagonista de GR, mifepristona, utilizada en cultivos celulares de tumores de mama y ovario es de 100 nM (E.M. Stringer-Reasor et al., 2015; Diana C. West et al., 2018; Maxwell N. Skor et al., 2013, entre otros).

Inicialmente, se llevaron a cabo ensayos de MTT para evaluar la viabilidad celular con esta concentración a distintos tiempos, con el objetivo de determinar el rango temporal adecuado para la realización de los experimentos.

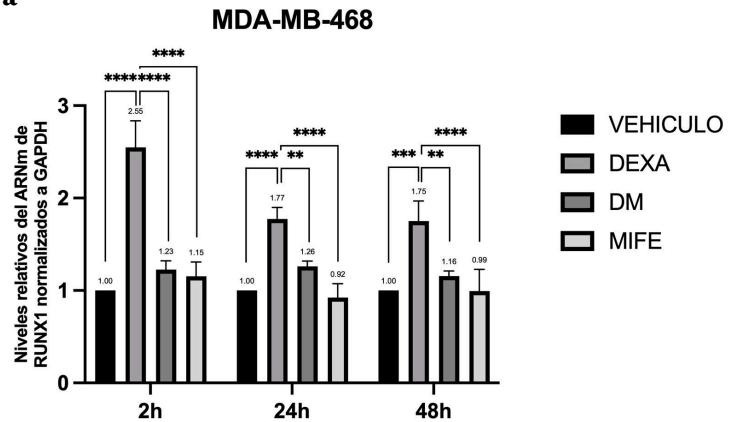


**Figura 56.** Ensayo de MTT. Porcentaje de células viables en función de distintos tiempos de tratamiento con el vehículo (etanol), dexametasona 100 nM, mifepristona 100 nM o la combinación para las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Se obtuvo un valor de absorbancia que representa las células remanentes que se tiñen con cristal violeta. Se consideró como 100% al tratamiento con el vehículo para cada tiempo.

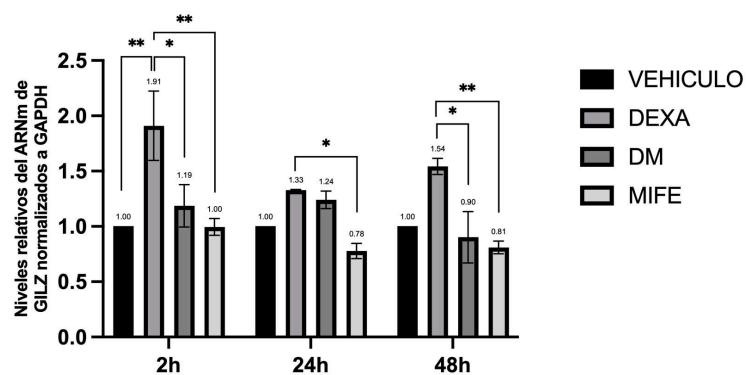
Tanto la dexametasona como el mifepristone no parecen afectar la viabilidad celular en estas líneas tumorales bajo los tiempos de tratamiento empleados. No se observó una disminución en la viabilidad celular en ningún momento evaluado, por lo que no se establecieron restricciones en la duración de los tratamientos.

A continuación, se midió la expresión de ARNm de RUNX1 tratando a las células con dexametasona (agonista de GR), con mifepristona (antagonista de GR) o la combinación de ambas. Para estos experimentos se usó suero charcolizado para evitar interferencia de hormonas presentes en el suero que pudieran regular GR. Además, también se midió la expresión del ARNm de GILZ (del inglés *glucocorticoid-induced leucine zipper*) como control del tratamiento con dexametasona ya que es un gen blanco del GR reportado (Ronchetti S. et al., 2015).

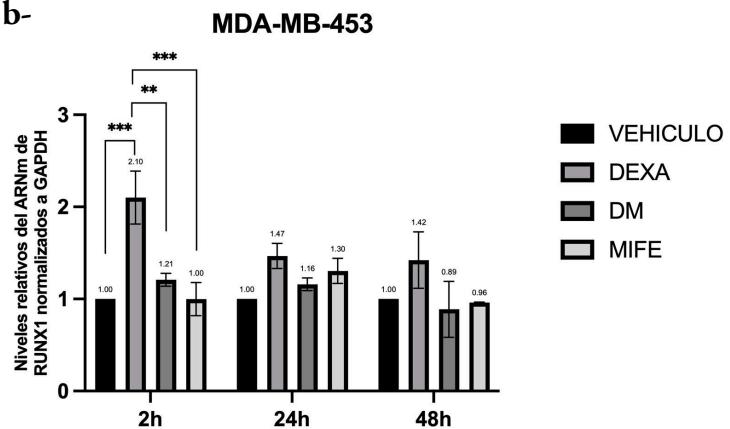
a-



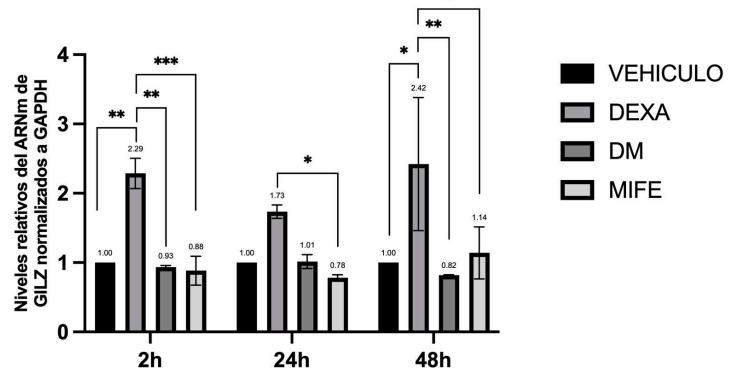
MDA-MB-468



b-

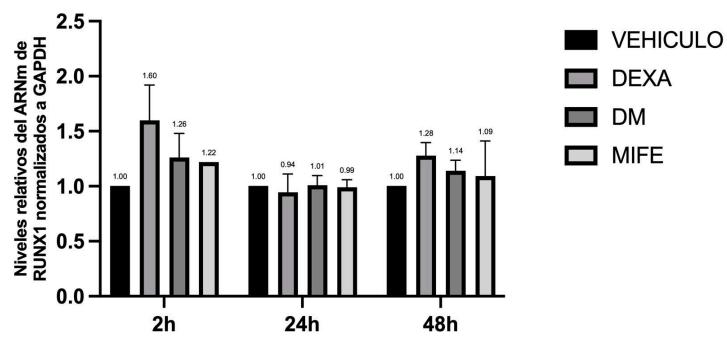


MDA-MB-453

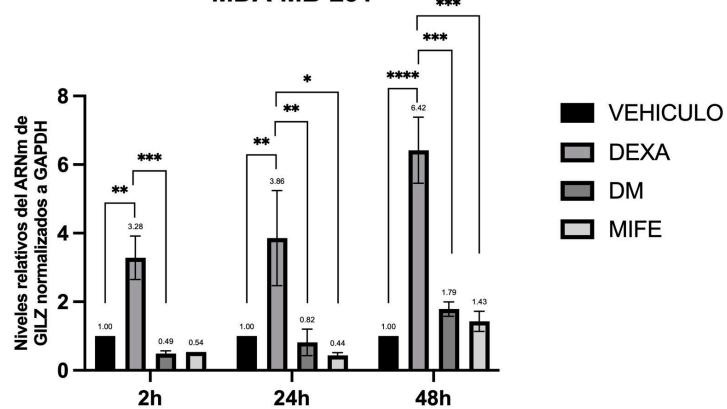


C-

## MDA-MB-231



## MDA-MB-231

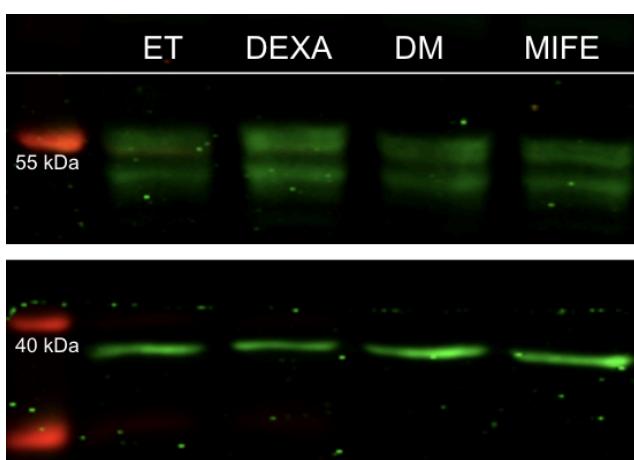


**Figura 57.** Expresión relativa del ARNm de *RUNX1* y *GILZ* medido por qPCR en **a-** MDA-MB-468, **b-** MDA-MB-453 y **c-**MDA-MB-231 en función del tiempo de tratamiento con vehículo, dexametasona, y este incremento se reduce cuando se añade mifepristona, como se muestra en la **Figura 57**. Esta reducción es específica, ya que se observa únicamente en presencia del antagonista de GR. Además, el aumento en la expresión de *RUNX1* ocurre de manera transitoria, alcanzando su pico a las 2 horas de estimulación. Este tipo de regulación rápida ha sido ampliamente descrito para el GR (John et al., 2009).

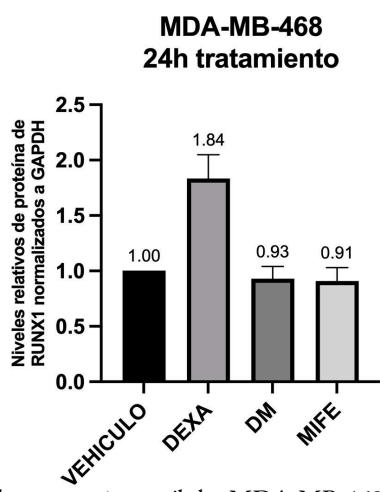
La expresión de ARNm de *RUNX1* aumenta significativamente en las líneas tumorales humanas MDA-MB-453 y MDA-MB-468 tras el tratamiento con dexametasona, y este incremento se reduce cuando se añade mifepristona, como se muestra en la **Figura 57**. Esta reducción es específica, ya que se observa únicamente en presencia del antagonista de GR. Además, el aumento en la expresión de *RUNX1* ocurre de manera transitoria, alcanzando su pico a las 2 horas de estimulación. Este tipo de regulación rápida ha sido ampliamente descrito para el GR (John et al., 2009).

También se midió la expresión de proteína de *RUNX1* a través de ensayos de Western Blot.

a-



b-



**Figura 58.** a- Western blot representativo de RUNX1 revelado por fluorescencia en células MDA-MB-468 tratadas por 24 horas con dexametasona 100 nM (DEXA), con mifepristona 100 nM (MIFE), con ambos (DM) o con etanol (ET, vehículo). Se indican los pesos aproximados del marcador de peso molecular. RUNX1 tiene un peso molecular de 55 kDa y GAPDH, de 37 kDa. b- Veces de cambio de la cuantificación de fluorescencia de las bandas correspondientes a RUNX1 normalizadas a GAPDH. N=2.

Como se puede observar en la **Figura 58**, RUNX1 aumenta con el tratamiento de 24 horas de dexametasona y vuelve a niveles basales con mifepristona.

#### Conclusiones del objetivo 4:

- Un análisis in silico muestra que el gen de RUNX1 posee sitios de pegado para el receptor de glucocorticoides.
- El tratamiento corto (2h) con dexametasona aumenta la expresión del mRNA de RUNX1, la cual vuelve a niveles basales bajo el tratamiento de mifepristona.
- La expresión de la proteína RUNX1 aumenta con 24 horas de dexametasona y vuelve a niveles basales con mifepristona.

Estos resultados sugieren que GR modula la expresión de *RUNX1* a través de la dexametasona y el mifepristone, convirtiendo a RUNX1 en un potencial target “drogable”. Planeamos futuros experimentos para seguir con esta línea del proyecto.

# CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El objetivo general de esta tesis fue investigar el rol de RUNX, con un enfoque inicial en RUNX1, en la biología tumoral del subtipo TNBC, considerando la diversidad de subpoblaciones tumorales que contribuyen a la heterogeneidad intratumoral y a la resistencia a la quimioterapia.

A lo largo de esta tesis trabajamos con distintos modelos celulares que representan diferentes perfiles funcionales del tumor o subpoblaciones. Entre ellas establecimos:

- Células adheridas de crecimiento estandarizado que suelen representar el crecimiento tumoral en monocapa con todas las limitaciones reportadas por falta de contexto fisiológico.
- Células suspendidas formando agregados, que se polarizan molecular y celularmente hacia un fenotipo de células tumorales circulantes o CTC.
- Mamósferas compuestas por células que se enriquecen en un fenotipo progenitor o *stem* tumorales (CSCs).
- Células resistentes a la droga paclitaxel (PX), utilizadas para el estudio de mecanismos de resistencia a la quimioterapia y migración.

Si bien la tesis se centró en el estudio de la **heterogeneidad intratumoral**, abordando únicamente algunas de las subpoblaciones celulares que lo conforman, no se incluyeron otros aspectos relevantes para el desarrollo tumoral, tales como el microambiente tumoral, la influencia del sistema inmunológico, la interacción entre los factores solubles secretados por las mismas y las subpoblaciones tumorales, las conexiones celulares directas por cercanía entre las distintas subpoblaciones dentro del tumor. El enfoque principal fue el estudio de la **respuesta y resistencia a las drogas quimioterapéuticas** como una consecuencia directa de la existencia de heterogeneidad intratumoral, dado que ésta genera poblaciones celulares con diferentes niveles de sensibilidad a los tratamientos frente a la regulación de la actividad transcripcional de RUNX1 y 2.

En este sentido, como mencionamos en introducción, uno de los mayores desafíos aún no resueltos en la terapia contra el cáncer es precisamente la presencia de células tumorales heterogéneas con diversa sensibilidad a los tratamientos que dificulta la eficacia de las estrategias clínicas.

Nuestro laboratorio se especializa en el estudio del factor de transcripción Runt-related 1 (**RUNX1**), perteneciente a la familia de factores de transcripción RUNX. Investigaciones previas realizadas por nuestro grupo han demostrado que RUNX1 promueve la agresividad tumoral en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Recouvreux et al., 2016; Fernández et al., 2023):

- RUNX1 y FOXP3 endógenos interactúan físicamente en células mamarias normales, y esta interacción bloquea la actividad transcripcional de RUNX1. Además, demostramos, mediante EMSA y ChIP que RUNX1 es capaz de unirse a los promotores de R-spondin 3 (RSPO3), SOX4 y Gap Junction Protein Alpha 1 (GJA1). A través de experimentos de pérdida de función con transfecciones reportamos que esta unión aumenta la expresión del oncogén *Rspo3* y suprime la expresión del gen supresor tumoral *GJA1* de manera dependiente de FOXP3. Asimismo, la reducción de la actividad transcripcional de RUNX1 disminuye las propiedades migratorias de las células tumorales. (Recouvreux et al., 2016).
- En colaboración con el grupo de la Dra Jennifer Richer identificamos, mediante experimentos de ChIP-seq en la línea celular MDA-MB-453, la unión del AR (receptor de andrógenos) a regiones regulatorias de RUNX1. Mostramos que esta unión es funcional dado que la expresión de *RUNX1* se encuentra aumentada por activación del AR mediante dihidrotestosterona (DHT) en la línea celular MDA-MB-453 y en tumores PDX (xenoinjertos derivados de pacientes) HCI-009 de TNBC AR<sup>+</sup>. Reportamos que RUNX1 se incrementa en un modelo experimental de células con características CSC en las líneas MDA-MB-453 y SUM-159PT; y su inhibición reduce la expresión de marcadores de CSC. Finalmente reportamos que la inhibición de RUNX1 en líneas TNBC-RA<sup>+</sup> disminuyó la viabilidad celular y aumentó la sensibilidad a paclitaxel y enzalutamida (Fernández et al., 2023).

→ Efecto de la pérdida de actividad de RUNX en la supervivencia celular

En primer lugar, con el fin de estudiar la relevancia de RUNX en las células tumorales, utilizamos el inhibidor comercial de RUNX (AI-10-104) en líneas celulares humanas de TNBC comerciales, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, que provienen de metástasis pleural de pacientes con cáncer de mama.

A lo largo de la tesis determinamos que inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la **viabilidad** de las células adheridas (**Figura 19**) y aumenta la **apoptosis** de las células tumorales crecidas en condiciones estándar (**Figura 21**) y en suspensión forzada (**Figura 23**). Esto sugiere que RUNX es necesario para mantener a las células viables: las células tumorales necesitan de la actividad transcripcional de este factor de transcripción para sobrevivir, y la pérdida de su función induce la muerte celular programada.

En particular, el modelo de células creciendo en suspensión, a diferencia de las células adheridas, presenta un alto nivel de muerte basal, lo que consideramos atribuible, al igual que en el caso de las células tumorales circulantes (CTC), a la ausencia de las señales intracelulares que inducen las moléculas que permiten la adherencia tumoral o a la falta de factores necesarios para su supervivencia en esta condición ambiental (Huang, Q. et al., 2018). Las CTCs que sobreviven lo hacen, en parte, debido a la adquisición de características *stem*, lo que promueve habilidades de supervivencia, migratorias e invasivas, así como resistencia a la terapia (Adorno-Cruz, V. et al., 2015).

→ Evaluación de la capacidad migratoria celular tras el bloqueo de la actividad transcripcional de RUNX

En un trabajo previo del laboratorio observamos, a través de la técnica de reparación de herida, que células transfectadas con una construcción dominante negativa de RUNX1 reducía la capacidad migratoria de cerrar la herida (Recouvreux et al 2016). En esta tesis aplicamos una estrategia diferente dado que algunas subpoblaciones no crecen adheridas y no pueden reparar heridas. Por esta razón elegimos el uso de *transwells* y evaluamos la participación de RUNX en las diferentes subpoblaciones. Utilizando el inhibidor comercial AI-10-104 observamos que la pérdida de función de RUNX disminuye la **migración** celular tanto en el modelo de células adheridas (**Figura 26**), como de células suspendidas (**Figura 27**) y de células resistentes a PX (**Figura 28**). Es decir que RUNX es necesario para que las células puedan movilizarse hacia otros sitios donde establecer metástasis en las tres subpoblaciones estudiadas. Particularmente en el caso del modelo de células en suspensión, la capacidad de inhibir la migración es altamente relevante, ya que estas células simulan a las células tumorales circulantes, cuya característica principal es su capacidad migratoria (Xiao, J. et al., 2021). Esta característica de las células tumorales tiene conexión con el proceso de EMT, en el cual las células adquieren la capacidad de invadir y migrar a través de la adquisición de un fenotipo mesenquimal y ha sido ampliamente

descrito en TNBC (Bulfoni, M. et al., 2016). En línea con estas observaciones ha sido recientemente reportado que el complejo RUNX1/CBF $\beta$ , es necesario para que ocurra este proceso en la línea celular TNBC MDA-MB-231. Además, la pérdida de CBF $\beta$  inhibe la capacidad de estas células para formar metástasis en hueso en un modelo *in vivo* (Ran Ran et al., 2020). Dado que, aunque en menor medida, las células siguen migrando aún sin RUNX funcional, es probable que estén ocurriendo dos situaciones: que el inhibidor no esté bloqueando todos los RUNX disponibles y/o haya otros factores contribuyendo para que la migración sea posible frente al QA.

→ Evaluación de la capacidad de RUNX de modular características de la subpoblación *stem*

En esta tesis reportamos que la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX impide la formación de mamósferas (**Figura 29**). Esta incapacidad de formar mamósferas sugiere que la actividad de RUNX es un factor limitante para que se forme la estructura y el resto de los procesos celulares no son suficientes para compensar su falta. Cabe destacar que la ausencia de mamósferas no se debe a un aumento en la muerte celular, ya que las células MDA-MB-231 cultivadas en medio *stem* no presentan apoptosis, aún con dosis altas de AI-10-104 (**Figura 24**). En contraste, en la población celular tratada con el vehículo del inhibidor (DMSO), sí se observó la formación de mamósferas verificando que las células tienen la capacidad de generar esas estructuras y no es un problema de la línea celular. Estos resultados indican que RUNX desempeña un papel fundamental en la generación y/o mantenimiento de CSC.

Con el fin de profundizar y evaluar la capacidad regulatoria de RUNX sobre **genes *stem***, utilizamos el modelo de células cultivadas en suspensión, donde determinamos que inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye significativamente la expresión de los genes *ALDH*, *OCT4* y *KLF4* en la línea celular MDA-MB-468 (**Figura 31**). Además, observamos que la expresión de *RUNX1* se encuentra aumentada y la de *RUNX2* no se modifica comparando con la población de células adheridas (**Figura 30**). **El incremento de *RUNX1* en la población de células en suspensión nos sugiere una mayor participación, comparada con la de *RUNX2*, en la adquisición de características *stem* de la población de CSC.** Por otro lado, la disminución en la expresión de genes *stem* en las células MDA-MB-468 ante el tratamiento con AI-10-104 indica fuertemente que RUNX participa en la regulación de la expresión de genes asociados al fenotipo *stem*. Este

resultado, junto con la incapacidad de formar mamósferas en las células MDA-MB-231, demuestran que RUNX favorece la capacidad *stem* de las células tumorales estudiadas.

Nuestro grupo reportó recientemente que la expresión del ARNm de RUNX1 también se encuentra aumentada en la población de células suspendidas con respecto a adheridas en la línea TNBC AR<sup>+</sup> MDA-MB-453 (Fernández et al., 2023). Además, observamos que la población ALDH<sup>+</sup>, sorteada a partir de la población de células suspendidas, exhibe una mayor expresión del ARNm de RUNX1 en comparación con la ALDH<sup>-</sup> en la línea celular SUM-159PT (Fernández et al., 2023). La aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) es un marcador de CSCs que se encuentra altamente expresado en TNBC en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Li et al., 2013; Ma et al., 2017). La expresión de ALDH1 en TNBC se asocia con mayor tamaño tumoral, estadios avanzados y mal pronóstico, incluyendo una menor supervivencia libre de recaída y supervivencia global (Ma et al., 2017; Panigoro et al., 2020). En el cáncer de mama, la expresión elevada de ALDH1, en particular ALDH1A1 y ALDH1A3, está asociada también con quimiorresistencia (Wei, Y. et al., 2022; Khoury, T. et al., 2012). En términos de resistencia a la terapia, Tanei y colaboradores (Tanei et al., 2009) realizaron un estudio clínico en 108 pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en paclitaxel y epirubicina. Al comparar la expresión de ALDH1A1<sup>+</sup> y CD24<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> entre las biopsias (pretratamiento) y la resección posterior (postratamiento), se observó un aumento significativo de células ALDH1A1<sup>+</sup>, mientras que no hubo cambios en las células CD24<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>. Estos hallazgos sugieren que las células ALDH1A1<sup>+</sup> podrían desempeñar un papel clave en la resistencia a la quimioterapia. También se observó que la reducción de la expresión de ALDH1A1 mediante una estrategia de knock down o silenciamiento génico provocó una sensibilización significativa de las células MDA-MB-468 y SUM159TP a paclitaxel, doxorrubicina y radioterapia (Croker AK et al., 2017). Así, además de su papel clásico como enzima de desintoxicación, estas evidencias sugieren que ALDH desempeña un papel también en la progresión de la enfermedad. En línea con este argumento, el uso del inhibidor de ALDH, ABD-3001, demostró un perfil de seguridad y signos tempranos de eficacia en un ensayo clínico de fase 1 para leucemia mieloide aguda refractaria/recidivante y síndrome mielodisplásico de alto riesgo (L. Benajiba et al., 2024). En esta tesis, reportamos que RUNX regula la expresión del ARNm de *ALDH1A1* en la línea MDA-MB-468, tanto en el modelo de adheridas como en el de suspendidas: inhibir la actividad transcripcional de RUNX disminuye la expresión de *ALDH1A1*. De esta manera, RUNX podría favorecer la resistencia a drogas aumentando los niveles de expresión de *ALDH1A1*, lo cual resulta

alentador en la combinación de tratamientos AI-10-104 con paclitaxel o doxorrubicina (**Figura 42 y 46**).

En este objetivo de la tesis, utilizando dos modelos de células *stem* (mamósferas y células polarizadas a CTCs con características *stem*), en dos líneas celulares diferentes (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), con distintos enfoques y midiendo diversos marcadores podemos concluir que RUNX es necesario para promover la capacidad *stem* de las líneas celulares humanas TNBC.

Nos interesa discutir que los reportes realizados en cáncer de mama **no-TNBC**, es decir tumores de mama ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup> y/o HER2<sup>+</sup>, presentan perspectivas contrarias. Por ejemplo, Hong y colaboradores describieron que RUNX1 reprime el fenotipo de CSCs de mama (BCSC): la expresión ectópica de RUNX1 en células premalignas de cáncer de mama MCF10AT1 suprime la formación de esferas tumorales y reduce la población de BCSCs (Hong D. et al., 2018). También se observó la represión de la capacidad *stem*, determinada mediante el ensayo de formación de mamosferas, tras la sobreexpresión de RUNX1 en líneas celulares epiteliales mamarias MCF10A (Kulkarni et al., 2018). De manera similar, Chimge y colaboradores revelaron que, en el cáncer de mama ER<sup>+</sup>, la ausencia de RUNX1 provoca un aumento en la expresión de marcadores de células madre (Chimge et al., 2016). Por último, Fritz y colaboradores elucidaron que RUNX1 y RUNX2 tienen efectos divergentes en las BCSCs aisladas de la línea celular MCF10AT1; específicamente, la baja expresión de RUNX1, acompañada de la sobre expresión de RUNX2, favorece EMT y mantiene las propiedades *stem* de las células MCF10AT1 (Fritz et al., 2020).

Esta diferencia en el comportamiento de RUNX1 en TNBC en comparación con otros subtipos de cáncer de mama no-TNBC, en relación a su influencia en la capacidad *stem*, acompaña la clínica actual de desarrollar tratamientos específicos para cada subtipo. Incluso al hacer investigación y escribir publicaciones, es muy importante aclarar los subtipos que se estudian y no evaluar un fenómeno incluyendo a todas las pacientes con cáncer de mama sin distinción pudiendo generar confusión. No obstante, incluso dentro de un mismo subtipo, pueden existir subpoblaciones celulares con comportamientos diferenciados que requieran enfoques terapéuticos distintos, como se observa en las **Figuras 43 y 44**.

En cuanto a RUNX2, se reporta que promueve la capacidad *stem* en el cáncer de mama ER+ y ER-: Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2020) encontraron que RUNX2 promueve el comportamiento maligno de las células de cáncer de mama MDA-MB-231

(TNBC) y MCF7 (no-TNBC) al promover el fenotipo de BCSCs: la capacidad de autorrenovación de las CSC, incluyendo la formación de colonias en agar blando, la formación de mamósferas y la capacidad de generar tumores en ratones nulos, se vio disminuida tras el silenciamiento de RUNX2. Por el contrario, la sobreexpresión de RUNX2 en las mismas líneas potenció todas estas capacidades de autorrenovación celular (Ping Zhang et al., 2020). Mediante el ensayo de formación de esferoides, se ha demostrado que RUNX2 actúa como un factor clave en la generación de BCSCs *in vitro* en la línea celular T47D ER<sup>+</sup> (Knutson TP et al., 2017). En el trabajo de Yin, X. et al., 2022 reportaron que la sobreexpresión de RUNX2 en células MDA-MB-231 conducen a un aumento en el volumen de los esferoides en un ensayo de formación de esferoides y la inhibición de RUNX2 disminuye la expresión de genes stem: *SOX2*, *NANOG*, *OCT4* y *KLF4* en las MDA-MB-231 y SUM159-TP.

Es interesante para nuestro laboratorio que RUNX2 se comporte en línea con RUNX1 en líneas celulares TNBC y de manera contraria en líneas celulares no-TNBC. Esto sugiere que hay algún mecanismo molecular que difiere entre ambos factores de transcripción. Por ejemplo, a partir de los resultados de esta tesis determinamos que la expresión de *RUNX1* aumenta en la población *stem* de células suspendidas, no así la expresión de *RUNX2*. Entonces, en nuestro modelo de estudio, ¿RUNX2 participa de la capacidad *stem*, en su generación, en su mantenimiento? Aún estamos explorando la relevancia de RUNX2 en estos procesos tumorales mencionados. Será de gran utilidad utilizar un inhibidor específico contra RUNX1 y otro contra RUNX2 para poder distinguir su participación en cada proceso.

#### → Participación de RUNX en el fenómeno de *dormancy*

Analizamos la capacidad de RUNX de regular la expresión de un marcador central de ***dormancy*** en tumores de mama, *NR2F1*. Elegimos el modelo de células MDA-MB-468 creciendo en suspensión forzada, dado que encontramos que la expresión del ARNm de *NR2F1* se encuentra significativamente aumentada en comparación con las células adheridas (**Figura 32**). En esta tesis observamos que la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX reduce significativamente la expresión de este gen tanto en células MDA-MB-468 adheridas como en suspendidas (**Figura 32**). **Este resultado sugiere que RUNX promovería una polarización hacia un potencial fenómeno de *dormancy*.** Además, uno de los últimos resultados preliminares de nuestro laboratorio

muestra que en las MDA-MB-231 cultivadas en suspensión forzada con medio *stem*, también disminuye la expresión del ARNm de *NR2F1* al inhibir la actividad transcripcional de RUNX (Tesis doctoral Facundo Couto).

Si bien la firma génica asociada a este estado de latencia ha sido mayormente descrita en cáncer de mama ER<sup>+</sup>, donde NR2F1 regula dicho fenómeno (se ha demostrado que ratones inyectados en la glándula mamaria con células MCF-7 transfectadas con siNR2F1 desarrollan tumores palpables con una proliferación acelerada; Kim RS et al., 2012), consideramos relevante evaluar este mecanismo en nuestro modelo de células en suspensión, ya que nuestra hipótesis fue que RUNX regulaba negativamente el gen de dormancy aumentando la proliferación tumoral y por lo tanto siendo responsable de la ausencia de un estado latente.

Aunque en pacientes con TNBC no se registra un período prolongado de *dormancy* comparado con otros tumores no-TNBC, quienes pueden estar hasta 25 años sin tumor detectable, ha sido reportado que el tratamiento quimioterapéutico podría favorecer este fenotipo incrementando la resistencia a drogas (Raghu Vamsi Kondapaneni et al., 2022; Murray D. et al., 2020; Dhimolea E. et al., 2021; Li S. et al., 2014).

Los enfoques propuestos para prevenir la recaída de metástasis de cáncer de mama en estado de *dormancy* pueden clasificarse en tres grupos (A. Recasens et al., 2019):

- 1) Eliminación directa de las células cancerosas en *dormancy*.
- 2) Activación de las células cancerosas en *dormancy* seguida de su eliminación con quimioterapia.
- 3) Mantener las células en un estado de *dormancy* de forma indefinida/crónica de manera asintomática para la paciente. Resulta beneficioso que las células permanezcan en este estado, ya que dejan de proliferar y se mantienen inactivas, lo que explica por qué algunas células tumorales pueden permanecer latentes durante años antes de generar metástasis.

Considerando nuestro resultado en el modelo de estudio elegido, la ausencia de actividad transcripcional de RUNX estaría “despertando” a las células que se encuentran en estado de *dormancy*. En consecuencia, las células dejarían de ser quiescentes y, perderían su resistencia a las terapias, haciéndose más susceptibles a la acción tóxica/citostática de los agentes quimioterapéuticos y disminuyendo así el riesgo de formación de metástasis en el futuro. Actualmente en el laboratorio se está llevando a cabo un ensayo de RNAseq con el propósito de conocer en qué procesos biológicos celulares participa RUNX. Este análisis

nos ayudará a comprender mejor qué otros genes participan en la señalización de RUNX y en qué procesos moleculares en particular tiene relevancia (Tesis doctoral Facundo Couto).

En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que, en nuestro modelo de estudio en TNBC, **RUNX funciona favoreciendo características de agresividad tumoral**.

→ Evaluación de la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en un ensayo *ex-vivo*

Con el propósito de avanzar hacia un modelo más complejo que las líneas celulares, realizamos un cultivo *ex vivo* a partir de la extracción de un tumor generado por la inyección de células MDA-MB-231 en un ratón NSG Jackson. El tumor generado *in vivo* contiene matiz extracelular, vasos y otras células pertenecientes al microambiente tumoral, excluyendo al sistema inmune. El tratamiento *ex vivo* del tumor con AI-10-104 mostró un aumento en la necrosis y una disminución en la viabilidad celular, reproduciendo el efecto observado en el cultivo celular aislado. Esto muestra que inhibir la actividad transcripcional de RUNX también es tóxico para las células que conforman el tejido tumoral generado en el ratón.

Nuestra hipótesis era que la proliferación celular, medida con KI67, disminuyera al inhibir la actividad transcripcional de RUNX con respecto al control; sin embargo no hubo modificación en los niveles de proliferación observados entre el grupo tratado y control. Dado que este fue un único experimento, no podemos concluir aún el efecto definitivo. Planificamos repetirlo cuando haya más ratones disponibles probando otras dosis del AI-10-104 y otros tiempos de tratamiento. Utilizar el modelo de xenoinjerto en ratón tiene mucha relevancia ya que, al utilizar tejidos vivos extraídos de pacientes, estos modelos mantienen características fisiológicas más cercanas a las condiciones naturales en comparación con los modelos *in vitro*, lo que mejora la relevancia clínica de los resultados. Los modelos 2D *in vitro* presentan limitaciones como la ausencia de microambiente: la falta de complementos de la matriz extracelular y de las barreras biofísicas a la invasión y hay acumulación de posibles mutaciones genéticas debido a los largos tiempos de cultivo. Los modelos 3D generados a partir de líneas celulares no sobreviven tanto tiempo *in vitro*, restringiendo los experimentos a plazos cortos; y también hay ausencia del microambiente que habría *in vivo*. (Roarty and Echeverría, 2021).

Este inhibidor usado en esta tesis ya fue probado en ratones. El tratamiento con AI-10-104 mejoró la sobrevida de ratones con linfoma tímico, un tipo de tumor causado por la

eliminación germinal de p53 en ratones, donde Runx1 se encuentra sobreexpresado (Date Y. et al., 2022). La administración de AI-10-104 a ratones mediante inyección intraperitoneal de una formulación con Captisol provocó efectos sedantes significativos en 30 segundos, de los cuales los ratones se recuperaron en aproximadamente 1 hora. En contraste, la administración de una formulación nanoparticulada resultó letal en aproximadamente 3,5 horas. Por lo tanto, para experimentos *in vivo*, se pasó al AI-14-91, que no induce los efectos sedantes observados con AI-10-104 y es bien tolerado por los ratones (Illendula et al., 2016). Para nuestros experimentos futuros *in vivo* planificamos utilizar este inhibidor que está siendo sintetizado por Fernando Duran (Departamento de Química Orgánica FCEN-UBA).

El próximo objetivo de la tesis fue evaluar la participación de RUNX en la respuesta al tratamiento de líneas celulares TNBC con las drogas quimioterapéuticas comúnmente utilizadas en la clínica: **antraciclinas (doxorrubicina) y taxanos (paclitaxel)**.

→ Evaluación de la expresión de genes de interés luego del tratamiento con drogas quimioterapéuticas

El tratamiento con doxorrubicina y paclitaxel incrementa la expresión del ARNm de *RUNX1* en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, respectivamente (**Figura 37**), así como la expresión del ARNm de *KLF4*, un marcador *stem*, en ambas líneas celulares (**Figura 38**), y de *GJA1*, un marcador de metástasis, en las MDA-MB-231 (**Figura 39a**). El incremento en la expresión de *RUNX1* en células tratadas con agentes quimioterapéuticos resalta su posible implicancia en los efectos que estas drogas ejercen sobre la célula. Es posible que *RUNX1* aumente para favorecer la supervivencia celular y/o evitar la inducción de la muerte celular programada (**Figuras 19 y 21**).

Ya se ha reportado que la quimioterapia puede inducir que las células cancerosas adquieran propiedades *stem* aumentando la expresión de genes involucrados en este fenómeno (Xingwang Hu et al., 2012; Khalid Abubaker et al., 2013; C. D'Alterio et al., 2020). De manera similar al aumento de expresión del ARNm de *RUNX1* en las células suspendidas (**Figura 30**), este aumento con doxorrubicina y paclitaxel puede estar relacionado con la adquisición de ese fenotipo *stem*, al igual que el aumento que se observa en la expresión del ARNm de *KLF4*. En estudios de resistencia a quimioterapia, usando líneas celulares humanas de osteosarcoma, la expresión de *KLF4* está significativamente aumentada frente al tratamiento con doxorrubicina promoviendo la generación de células CSC-*like* (Li

Yangling et al., 2017). Nuestros resultados indican que en este contexto podría estar sucediendo un fenómeno similar.

Investigando a la conexina Cx43 (cuyo gen es *GJA1*), la bibliografía reporta que se comporta como un gen supresor de tumor en cáncer de mama temprano y oncogen en estadios tardíos de progresión (K. Stoletov, et al., 2013; T. Aasen et al., 2016). Esto se explica en una primera instancia con la progresión del tumor primario acompañada por una reducción en la expresión de conexinas y pérdida de comunicación intercelular por gap junctions. Esta pérdida de gap junctions permite a las células despegarse del microambiente tumoral aumentando la habilidad de las células para migrar. Y luego, en períodos más tardíos, las conexinas aumentan su expresión permitiendo a las células invadir, interactuar con células endoteliales y extravasar a distintos órganos (K. Stoletov, et al., 2013; T. Aasen et al., 2016). Por lo tanto, lo que observamos en la **Figura 39**, si bien se trata del modelo de MDA-MB-231 adheridas, podría estar asociado a un fenotipo más tardío en la progresión tumoral y explicar este resultado por el hecho de que la línea haya sido generada a partir de una metástasis. Además, fue demostrado que una alta expresión del ARNm de *GJA1* está asociada a una reducción en la supervivencia libre de recaída y en la sobrevida general en pacientes ER<sup>+</sup> (Teleki I. et al., 2014). La expresión de *GJA1* disminuye ante el tratamiento con AI-10-104 en la línea MDA-MB-231 (**Figura 39b**) indicando que RUNX ejerce un efecto activador de la expresión génica de *GJA1*. Sin embargo, nuestro grupo de investigación reportó previamente que las células transfectadas con la construcción dominante negativa de RUNX1 presentan un aumento en los niveles de *GJA1*, lo que evidencia un papel inhibitorio de RUNX1 en la expresión génica de *GJA1* (Recouvreux et al., 2016). Estos resultados sugieren que la modulación de *GJA1* observada tras el tratamiento con AI-10-104 podría estar influenciada por la actividad de RUNX2. En el contexto de nuestro experimento, RUNX1 y RUNX2 están inhibidos, ya vimos que si RUNX1 está inhibido, la expresión de *GJA1* aumenta; por lo tanto, acá RUNX2 está compitiendo con RUNX1 para modular la expresión de *GJA1*, finalmente favoreciendo la activación de su expresión.

Con el propósito de evaluar la expresión de RUNX1 en las células resistentes a paclitaxel (PX), se analizó su nivel de expresión proteica y su localización mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos nos muestran que la población celular resistente a PX presenta niveles significativamente mayores de la proteína RUNX1 en

comparación con la población celular control (**Figura 40**). Además, su localización mayoritariamente nuclear de RUNX1 implica que está activo como factor de transcripción. Este dato junto con los anteriores nos permite especular con que la expresión de RUNX1 se encuentra diferencialmente expresada en las distintas subpoblaciones celulares dentro del tumor: células con fenotipo *stem* representando a las células tumorales circulantes (**Figura 30**) y células resistentes a PX (**Figura 40**). Asimismo podemos sugerir que los niveles de expresión de RUNX1 señalan heterogeneidad intratumoral en estas líneas celulares expuestas a diferentes contextos. **En términos de sensibilidad a drogas observamos que las poblaciones con mayor expresión de RUNX1 son las más resistentes a quimioterapia, es decir que RUNX1 podría desempeñar un papel clave en la adquisición de resistencia a este fármaco.**

Como mencionamos previamente, RUNX2 ha sido reportado en varias publicaciones como promotor de resistencia a quimioterapia:

- Othman y colaboradores (Othman A. et al., 2022) encontraron que el silenciamiento de RUNX2 aumenta la sensibilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 a los agentes dirigidos a los microtúbulos, como nocodazol y vinblastina.
- RUNX2 promueve la expresión de la metaloproteínaasa 1 de matriz (MMP1) y favorece la agresividad y la quimiorresistencia a epirubicina en células TNBC MDA-MB-231 y SUM159 (Si W. et al., 2022).
- Jeselsohn y colaboradores (Jeselsohn R. et al., 2017) encontraron que RUNX2 puede interactuar con ER $\alpha$  para inducir directamente la transcripción de SOX9 y reducir la sensibilidad de las células de cáncer de mama a tamoxifeno.
- Geter y colaboradores (Geter PA et al., 2017) demostraron que RUNX2 se encuentra transcripcionalmente aumentada tanto en células LCC9 resistentes a tamoxifeno (TAM) como en xenoinjertos derivados de pacientes obtenidos de líneas celulares resistentes a TAM. Esto sugiere que RUNX2 desempeña un papel central en la resistencia a fármacos en el cáncer de mama ER+. Además, RUNX2 promovió la metástasis en este tipo de cáncer, y su silenciamiento fue capaz de restaurar significativamente la sensibilidad de las células a TAM.
- Wang y colaboradores (Wang XX et al., 2018) demostraron en pacientes sensibles y resistentes a taxanos y antraciclinas que el miR-4530 sérico podría sensibilizar el cáncer de mama (sin especificar subtipos) a la quimioterapia neoadyuvante mediante la supresión de RUNX2.

- Los tumores con sobreexpresión de RUNX2 son insensibles a los tratamientos con terapia endocrina o inhibidores de FGFR (MS Rodriguez et al., 2024).

También se vio su participación en resistencia a quimioterápicos en otros tumores, como osteosarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, entre otros.

Aún seguimos explorando la relevancia de RUNX2 en estos procesos mencionados, queda pendiente en este experimento donde tratamos a las células con doxorrubicina y paclitaxel medir la expresión de RUNX2 para estudiar, si al igual que RUNX1, es modulado. También debemos hacer una revisión exhaustiva de las publicaciones en donde se evalúa RUNX2 y estudiar si RUNX1 es evaluado en esos trabajos.

#### → Evaluación del tratamiento combinado: AI-10-104 y drogas quimioterápicas

Para evaluar si la inhibición de RUNX modifica la sensibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterápicos, se incorporó AI-10-104 a los experimentos de toxicidad. Se observó que las células MDA-MB-231 transfectadas con el plásmido que contiene la versión dominante negativa de RUNX1 y expuestas a doxorrubicina presentan una menor viabilidad celular en comparación con los tratamientos individuales (**Figura 41**). De manera similar, el tratamiento con AI-10-104 en combinación con doxorrubicina o paclitaxel reduce significativamente la viabilidad celular (**Figura 42**) y aumenta de manera significativa la apoptosis (**Figura 43**) en ambas líneas celulares, en comparación con cada tratamiento por separado. Además, el tratamiento con AI-10-104 y doxorrubicina disminuye de forma significativa el número de mamósferas en las MDA-MB-231 en comparación con los tratamientos individuales (**Figura 46**). Estos resultados sugieren que **la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX aumenta la sensibilidad de las células a estos agentes quimioterápicos, tanto en células adheridas como en mamósferas.**

Sin embargo, en condiciones de crecimiento en suspensión forzada, modelo que simula las células tumorales circulantes (CTC), el tratamiento con AI-10-104 en combinación con doxorrubicina o paclitaxel no produjo cambios en la apoptosis en comparación con los tratamientos individuales en ninguna de las dos líneas celulares (**Figura 44 y 45**). Este resultado sugiere que las CTCs podrían representar un estadio de la enfermedad en el que se

han desarrollado mecanismos de resistencia distintos a los de las células adheridas y mamosferas para tolerar la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos. Los contactos célula-célula en esferoides compactos o agregados celulares modifican la resistencia al tratamiento antineoplásico (proporcionando una respuesta a fármacos más fisiológica) (Salinas-Vera et al, 2022). En este contexto, la inhibición de RUNX podría no ser una estrategia terapéutica eficaz en esta subpoblación celular. La bibliografía muestra que aun teniendo pocas CTCs/ml es indicativo de peor pronóstico o mayor riesgo de recaída que no tener CTCs. Por ejemplo, pacientes con TNBC metastásico con  $\geq 5$  CTCs en 7.5 mL de sangre mostraron tanto una supervivencia libre de progresión (PFS) como una supervivencia global (OS) más cortos que con menores CTCs/ml (Peeters, D.J.E. et al., 2014).

Una conclusión muy importante obtenida a partir de los resultados de este objetivo es que **RUNX actúa favoreciendo un comportamiento agresivo que podría promover la heterogeneidad intratumoral y su consecuente resistencia a las drogas**. Los resultados de esta tesis proponen que, debido a la presencia de distintas subpoblaciones celulares que contribuyen a dicha heterogeneidad, la investigación futura debería centrarse en establecer una terapia personalizada que tenga en cuenta no sólo los perfiles genéticos y moleculares de cada tumor, sino también las subpoblaciones celulares que lo componen y cómo cada una responde a las terapias seleccionadas. Por este motivo, fue muy determinante estudiar el mismo proceso biológico en las distintas subpoblaciones celulares provenientes de una misma línea celular sometidas a las distintas drogas y evaluar los diferentes efectos generados. Por ejemplo la inducción de apoptosis resultante de la combinación de doxorrubicina o paclitaxel con AI-10-104 en el modelo de adheridas y en el de suspendidas, determinamos que en el modelo de adheridas presenta diferencias con respecto a los tratamientos por separados, pero en el modelo de suspendidas no. Es decir, determinamos que existen subpoblaciones tumorales que son sensibles a la ausencia de RUNX, mientras que otras, como las CTCs, no presentan esta sensibilidad y, por lo tanto, requerirían un enfoque terapéutico diferente.

En nuestro grupo ya hemos observado efectos diferenciales de la inhibición de RUNX comprando células adheridas con suspendidas. En la tesis de licenciatura Facundo Couto determinó que la inhibición de RUNX en células adheridas aumenta la expresión del factor *stem* KLF4 en forma dosis y tiempo respuesta, mientras que en las células suspendidas el

efecto es contrario (Couto FL 2023). Intentaremos clarificar estas diferencias con el ensayo de RNAseq que está en desarrollo.

En línea con estas conclusiones en estudios con muestras de pacientes se reportó que el nivel de expresión de ER, PR o HER2 de una lesión metastásica confirmada por biopsia puede variar con la patología del tumor primario en una fracción sustancial de pacientes (que varía entre el 15 % y el 40 % de la cohorte de pacientes) (Macfarlane R et al., 2012; Lindstrom LS et al., 2012). Diferencias similares también se observan en los grupos de CTC cuando se evalúan los biomarcadores del cáncer de mama. En un estudio centrado en el desarrollo de un panel multimarcador para la caracterización de CTCs en pacientes con cáncer de mama metastásico, se observó que las CTCs eran HER2 positivos en el 27 % de los pacientes con enfermedad HER2 negativa (de Albuquerque et al., 2012). En un estudio previo con 254 pacientes que evaluaba CTCs positivos para ER, la concordancia entre el tumor primario y los CTCs fue solo del 28 %. Además, dentro de la población de CTCs, la expresión de ER fue heterogénea en el 26 % de los pacientes (Fehm T et al., 2008). Por lo tanto, definir las terapias dirigidas únicamente contra biomarcadores expresados en el tumor primario podrían resultar ineficaces frente a las variaciones de expresión en CTCs.

Es posible que esta diversidad en la sensibilidad también está sucediendo en nuestro modelo de células en suspensión comparado con las adheridas. Esta divergencia reportada en pacientes podría explicar por qué nuestras células en suspensión no son susceptibles en la misma proporción que las adheridas a la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en términos de apoptosis, resaltando así la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas específicas para cada subpoblación tumoral.

Asimismo, las CTCs generadas en esta tesis podrían encontrarse en un estado de *dormancy*. Vishnoi y colaboradores aislaron y caracterizaron CTCs de pacientes con cáncer de mama (sin especificar subtipos) en *dormancy* usando los marcadores uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) y int  $\beta$ 1 (integrina  $\beta$ 1) (Vishnoi et al., 2015). Este podría ser otro motivo por el cual, en nuestro modelo, las células en suspensión no son sensibles a la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en combinación con quimioterapia. De hecho, las células en suspensión forzada presentan una mayor expresión del marcador de *dormancy*, NR2F1 (**Figura 32b**). Aunque el inhibidor de RUNX reduce su expresión (**Figura 32b**), es posible que esta disminución no sea suficiente para sacar a las células del estado de quiescencia y hacerlas más sensibles a los tratamientos, o que haya otros marcadores de dormancy que contrarrestan esa disminución de *NR2F1*.

Siguiendo con la idea de heterogeneidad intra tumoral, en células resistentes a PX la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX permite “recuperar” la sensibilidad a esta droga quimioterapéutica, comparado con las células no resistentes (**Figura 47b**). Cabe destacar que ambas poblaciones (R-DMSO y R-PX) presentan la misma sensibilidad al inhibidor AI-10-104, lo que indica que la generación de resistencia a PX no condujo a resistencia cruzada a AI-10-104 (**Figura 47a**). Por lo tanto, nuestro hallazgo tiene implicancias clínicas significativas, ya que sugiere que la combinación de estas drogas podría ser efectiva. La resistencia cruzada entre dos o más drogas es un fenómeno descrito en la literatura que por lo general se produce por la sobreexpresión de transportadores ABC que excluyen moléculas sin especificidad (Duan, Z. et al., 2009; Nana Ji et al., 2010; H. Thomas et al., 2003; W. Li et al., 2016; Tegze B et al., 2012). **En conjunto, estos resultados indican que RUNX podría contribuir al desarrollo de resistencia adquirida por las células tras la exposición continua a tratamientos con PX.** Para confirmarlo, deberíamos generar células resistentes bloqueando RUNX todo el tiempo con una dosis sub-lethal. Es uno de los experimentos planeados a futuro, pero quizás nunca se logre la generación de resistencia sin RUNX porque RUNX es necesario para la sobrevida.

→ Estudio de la relevancia de los transportadores ABC en nuestro modelo de estudio

En la búsqueda de los mecanismos moleculares que pudieran explicar la mayor sensibilidad de las células a las drogas quimioterapéuticas al inhibir la actividad transcripcional de RUNX, encontramos en bibliografía una relación entre RUNX1 y los transportadores ABC en otros tipos de tumores: En células de glioblastoma se ha demostrado que el eje RUNX1/miR-128-3p promueve la expresión de ABCC1 (Jianglong Xu et al., 2021). Además, se ha reportado que RUNX1 promueve la expresión de ABCG2 en células de cáncer colorrectal (Qingyuan Li et al., 2021). También, se demostró que RUNX1 es inhibido directamente por miR-27a, que participa en la regulación de la quimiosensibilidad en el cáncer de vejiga mediante la reducción de la expresión de P-gp y el aumento de la apoptosis (Deng Y. et al., 2015). Estos antecedentes nos sugirieron analizar el vínculo de ambas proteínas en el contexto de TNBC y las subpoblaciones celulares seleccionadas.

La expresión del ARNm del transportador *ABCC1* se encuentra ligeramente aumentada en la población suspendida en comparación con la población adherida de las MDA-MB-468 y

disminuye significativamente en las células suspendidas tras la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX (**Figura 50**). Estos resultados sugieren que RUNX regula la expresión de *ABCC1* en las células MDA-MB-468, potencialmente confiriéndoles mayor resistencia a las drogas quimioterapéuticas. La “recuperación” de sensibilidad a PX en esta línea celular al inhibir la actividad transcripcional de RUNX podría ser a través del aumento de la acción de PX por pérdida de *ABCC1*. La inhibición de la actividad transcripcional de RUNX en células en suspensión forzada podría potenciar el efecto tóxico de las drogas al reducir su excreción, como pensamos que ocurre en las células resistentes a PX. Por este motivo, decidimos medir la retención de la doxorrubicina en el interior de la célula, aprovechando su autofluorescencia, mientras se inhibía la actividad transcripcional de RUNX. Sin embargo, su acumulación en el interior celular no se ve afectado por la inhibición de RUNX en las MDA-MB-231 y MDA-MB-468, ni en condiciones adherentes ni en suspensión en las condiciones experimentales elegidas (**Figuras 52 y 54**). Además, la localización subcelular del transportador Pgp no se ve afectada por el tratamiento con AI-10-104 en las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231 (**Figura 49**). De manera similar, en las poblaciones control y resistentes a PX, la localización subcelular de PGP y ABCG2 no presentan modificaciones tras el tratamiento con AI-10-104 en comparación con las tratadas con vehículo (**Figura 51**). Estos resultados indican que RUNX no regula la retención de doxorrubicina, ni la expresión ni la localización de Pgp y ABCG2. No obstante, la pérdida de función de RUNX aumenta la sensibilidad de las células a la doxorrubicina (**Figura 42, 43 y 46**). Por lo tanto, **la sensibilidad a los fármacos inducida por AI-10-104 podría estar más relacionada con la pérdida del fenotipo stem que con la regulación de los transportadores ABC**.

Aún es necesario profundizar en el estudio del transportador ABCC1 y su relación con RUNX en el contexto de TNBC, dado su posible impacto en la resistencia a drogas quimioterapéuticas. Por ejemplo, repetir los ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra dicha proteína, evaluar su expresión mediante ensayos de Western Blot, estudiar si tiene posibles sitios de pegado para RUNX y seguir evaluando retenciones de doxorrubicina y PX como mecanismos de toxicidad.

Algunos factores de transcripción inductores de EMT (EMT-TFs) promueven la resistencia a drogas aumentando la salida de los fármacos a través de los transportadores ABC; esto está respaldado por datos que muestran sitios de unión de los EMT-TFs en los promotores de genes que codifican transportadores ABC (Saxena, M. et al., 2011). Como mencionamos previamente, RUNX1 es necesario, junto con CBF $\beta$ , para que las células tumorales TNBC

puedan realizar EMT (Ran Ran et al., 2020) . RUNX1, a su vez, promueve la expresión de transportadores ABC en otros tipos tumorales (Jianglong Xu et al., 2021; Qingyuan Li et al., 2021). Esta data sugiere que podría haber una vía de señalización involucrando a RUNX1, factores de transcripción maestros de EMT, como Slug (Ran Ran et al., 2020), los transportadores ABC y la resistencia a quimioterapia.

#### → Evaluación de la regulación exógena de la expresión de RUNX1

Finalmente, con el objetivo de encontrar modulación exógena de la expresión de RUNX1, se llevó a cabo un análisis *in silico*, el cual reveló la presencia de sitios de unión para el receptor de glucocorticoides (GR) en el gen *RUNX1* (**Figura 55**). El tratamiento con dexametasona durante 2 horas incrementó significativamente la expresión del ARNm de *RUNX1*, la cual retornó a niveles basales tras la administración de mifepristone indicando una regulación específica del gen (**Figura 567**). De manera consistente, la expresión de la proteína RUNX1 también aumentó luego de 24 horas de tratamiento con dexametasona y se redujo a niveles basales con mifepristone en la línea celular MDA-MB-468, indicando que a pesar de obtener un aumento del mensajero frente a un estímulo de tiempo corto, el aumento de proteína se conserva en el tiempo (**Figura 58**).

Es interesante destacar que, al igual que con RUNX1, la búsqueda bibliográfica demuestra un rol antagónico de GR en los subtipos ER<sup>+</sup> y ER<sup>-</sup> de cáncer de mama pudiendo actuar como gen supresor de tumor o como oncogén respectivamente. De manera notable, en pacientes con cáncer de mama ER<sup>+</sup>, niveles elevados de expresión de GR en los tumores se asociaron fuertemente con un resultado más favorable. Sin embargo, en tumores ER<sup>-</sup> y TN con mayor expresión de GR, se espera una supervivencia más corta a largo plazo y un mayor riesgo de recurrencia (Abduljabbar, R. et al., 2015; Pan, D. et al., 2011; West, D. C. et al., 2016; Conway, M.E. et al., 2020). A nivel molecular ha sido reportado que la activación de GR induce EMT, renovación de CSC y resistencia a paclitaxel, en parte a través de la inducción de YAP, en líneas celulares de TNBC: MDA-MB-231, BT-549 y SUM-159 (Sorrentino et al., 2017). A su vez, si se bloquea la actividad de GR con su antagonista mifepristone, se reduce el número de CSC en un modelo de líneas celulares de TNBC: HCC1937 y SUM149PT y se suprime su autorrenovación (Liu et al., 2016). Más aún, en los últimos años se suman evidencias que muestran efectos tumorigénicos de GR promoviendo la resistencia a quimioterapia y la metástasis en ratones NSG inyectados con MDA-MB-231 tratadas con dexametasona. Por otro lado, la activación de GR contrarrestó

los efectos del tratamiento con paclitaxel, lo que resultó en un aumento de metástasis y una reducción de la supervivencia en comparación con los ratones que no recibieron dexametasona (Obradović et al., 2019).

En línea con nuestra hipótesis de trabajo, se ha reportado que la activación del GR puede inducir un estado de *dormancy* reversible en células cancerosas de pulmón, caracterizado por tolerancia a fármacos anticancerígenos y la activación de vías de señalización de factores de crecimiento que promueven la supervivencia celular (Stefan Prekovic et al., 2021). En nuestro modelo, GR, a través de dexametasona, aumenta la expresión de RUNX1 (**Figura 57 y 58**), y por otro lado, RUNX promueve la expresión de *NR2F1* en el modelo de células adheridas y de suspendidas (**Figura 32**), volviendo a niveles basales tras la inhibición de la actividad transcripcional de RUNX (**Figura 32**).

Este capítulo también abre muchos nuevos interrogantes para investigar el rol del eje GR-RUNX1 en la quimioresistencia de TNBC. Sobre todo porque el uso de agonistas sintéticos del GR, como la dexametasona y la prednisona, es una práctica usual en la clínica de manera frecuente para reducir efectos colaterales de tratamientos quimioterapéuticos. Los glucocorticoides ayudan a disminuir vómitos, alergias, edema y dolor (Volden, P.A. et al., 2013; Butz, H. et al., 2022; Mojica, C.A.R et al., 2020). Sin embargo, su papel en el cáncer de células epiteliales ha sido controvertido. En cáncer de colon, riñón, vejiga, próstata, cérvix, ovario y páncreas, el tratamiento con glucocorticoides induce resistencia a fármacos citotóxicos o terapias de radiación (Annett, S. et al., 2022; Herrera, R.A. et al., 2022; Wang, H. et al., 2007).

Un ensayo clínico en fase 1 (NCT01493310) mostró que el GR podría ser un blanco prometedor en TNBC, dado que pacientes TNBC-GR<sup>+</sup> respondieron positivamente a la combinación de antagonistas del GR (mifepristone) y quimioterapia (paclitaxel) (Nanda et al., 2016). La fase II (NCT02788981) reportó que la adición de mifepristone a nab-paclitaxel (nab-Pac) no mejoró significativamente la supervivencia libre de progresión en comparación con nab-Pac solo en pacientes con cáncer de mama metastásico. Sin embargo se observó una tendencia hacia la mejora en la supervivencia global (Nan Chen et al., 2025).

No sólo la funcionalidad de RUNX podría ser regulable (ya descripta a través de RA por nuestro grupo en Fernández et al., 2023). Hay otras formas de regular a RUNX. La función del complejo RUNX está determinada por una amplia y altamente dinámica gama de modificaciones postraduccionales que afectan su expresión génica, actividad proteica,

localización subcelular y estabilidad (Ito Y. et al., 2015). Es evidente que las proteínas RUNX están reguladas por una compleja interacción entre estas modificaciones, lo que constituye un nivel clave de regulación de su actividad transcripcional. Es importante destacar que la desregulación de estos mecanismos sutiles de regulación ha demostrado desempeñar un papel clave en el desarrollo de diversas enfermedades (Ito et al., 2015). Si ahondamos en el estudio de estas modificaciones postraduccionales, podríamos encontrar alguna manera de inhibir la actividad de RUNX.

### RUNX en el ecosistema tumoral: conclusión final

Durante la última década, los estudios sobre las proteínas RUNX en tumores sólidos han avanzado considerablemente, lo que sugiere que estas proteínas están directamente involucradas en diferentes etapas del desarrollo tumoral, incluidas la iniciación, progresión e invasión del tumor (RUNX Proteins in Development and Cancer, 2017). Además, las proteínas RUNX desempeñan un papel en la angiogénesis tumoral (Lee, Y.M. et al., 2022), el mantenimiento de la capacidad *stem* de las células tumorales (Deltcheva and Nimmo, 2017) y la resistencia a fármacos antitumorales (Wang X. et al., 2015; Giricz O. et al, 2018; Dhadve AC. et al., 2020; Xiao L et al., 2020; Z Zhang et al., 2020; Xu J. et al., 2021; Q. Li et al., 2021; Fernández et al., 2023; She C. et al., 2023). Estos hallazgos han llevado a considerar a RUNX como un biomarcador tumoral.

Al comienzo de esta tesis mencionamos que, en un inicio, el estudio se centraba exclusivamente en RUNX1. Sin embargo, posteriormente nos dimos cuenta que era necesario incluir el análisis de RUNX2, dado que las células también expresan este factor de transcripción y el compuesto AI-10-104 inhibe la actividad transcripcional de ambos. A lo largo de la tesis sólo pudimos discernir entre uno y otro en los siguientes experimentos:

- cuando transfecmos el plásmido con la construcción dominante negativa de RUNX1, y demostramos que las células son más sensibles a doxorrubicina cuando la actividad transcripcional de RUNX1 está inhibida (**Figura 40**).
- cuando medimos la expresión de *RUNX1* comparando la población de células adheridas y la población de células suspendidas, en la cual la expresión de *RUNX1* se encuentra aumentada y la de *RUNX2* no se modifica, sugiriendo que RUNX1 podría ser más relevante que RUNX2 en esta subpoblación para las características tumorales evaluadas (**Figura 28**).
- cuando medimos la expresión de *RUNX1* tras el tratamiento con doxorrubicina o paclitaxel observando un aumento en su expresión (**Figura 36**).

- cuando medimos la expresión de la proteína RUNX1 comparando la población de células resistentes a PX con la población control, sugiriendo un rol de RUNX1 en la adquisición de resistencia a este fármaco (Figura 39).

Algunas publicaciones sobre RUNX1 y la resistencia a drogas en otros tumores han sido publicadas en el transcurso de mi doctorado:

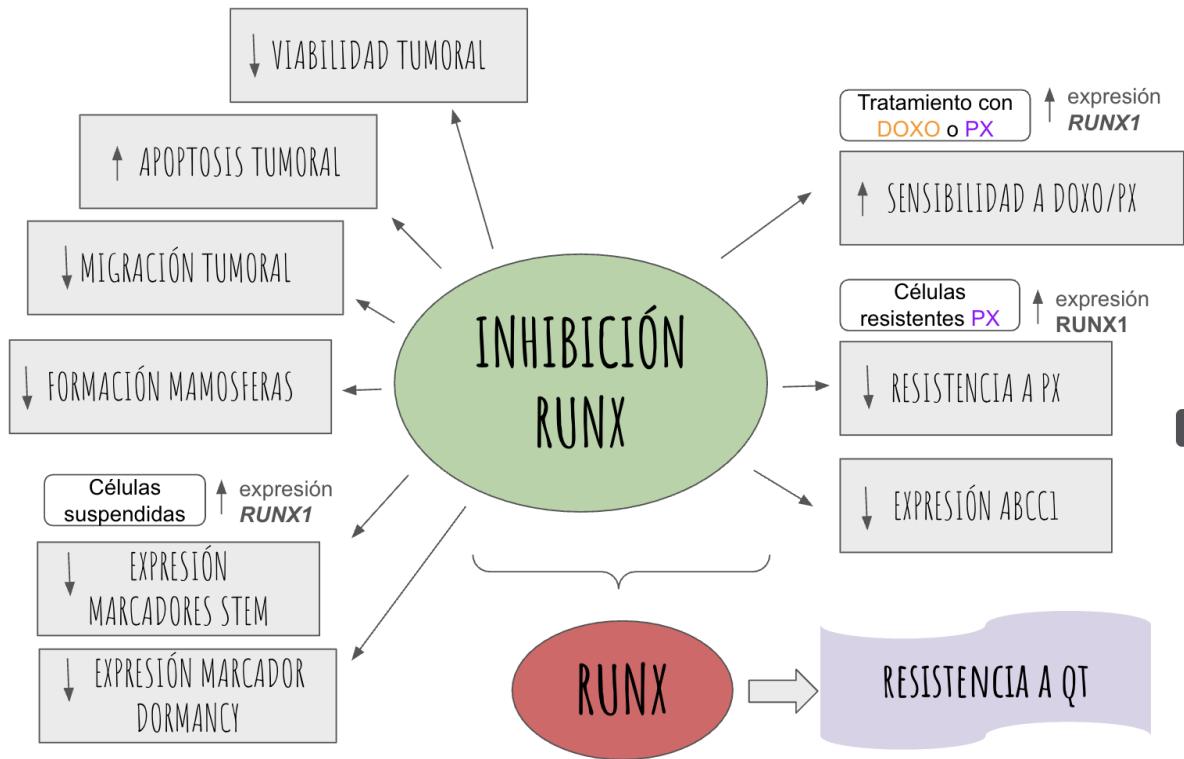
- RUNX1 es inhibido directamente por miR-27a, que participa en la regulación de la quimiosensibilidad en el cáncer de vejiga mediante la reducción de la expresión de P-gp y el aumento de la apoptosis (Deng Y. et al., 2015).
- Wang y colaboradores demostraron que RUNX1 regula negativamente la expresión de miR-101 en células de cáncer de pulmón, lo que reduce el efecto sensibilizador de miR-101 al cisplatino en la quimioterapia del cáncer de pulmón (Wang X. et al., 2015).
- La hiperactivación del eje de señalización RUNX1/IL-34/CSF-1R está asociada con la resistencia del melanoma a los inhibidores de BRAF-V600E (Giricz O. et al, 2018).
- En el carcinoma epitelial de ovario, RUNX1 se une de manera sinérgica a la región promotora del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) junto con FOXO3a, contribuyendo a la sobreexpresión de la expresión de IGF1R, relacionado con el desarrollo de resistencia a platino-paclitaxel (Dhadve AC. et al., 2020). La represión de la transactivación dependiente de RUNX1/CBF $\beta$  mediante el inhibidor Ro5-3335 provocó una reducción significativa de la actividad del promotor de IGF1R y un aumento en la sensibilidad a platino-paclitaxel (Dhadve AC. et al., 2020).
- En el cáncer de ovario, RUNX1 regula negativamente la expresión del grupo de microARN miR-17-92, lo que provoca una sobreexpresión de BCL2, el blanco directo de miR-17-92. Esto da lugar a una inhibición significativa de la apoptosis inducida por cisplatino, lo que podría estar asociado con la resistencia a este fármaco (Xiao L et al., 2020).
- RUNX1 interactúa con YAP para promover la transcripción de HDAC2, el cual es necesario para la quimiorresistencia a 5-FU en las células MCF-7 y T47D de cáncer de mama (Z Zhang et al., 2020).
- Xu y colaboradores reportaron que RUNX1 desempeña un papel oncogénico en el glioblastoma adulto (GBM) y que induce resistencia a la temozolomida en GBM mediante la sobreexpresión de MRP1, el cual está negativamente regulado por miR-128-3p (Xu J. et al., 2021).
- En el cáncer colorrectal, se descubrió que RUNX1 aumenta la quimiorresistencia a 5-FU mediante la activación de la vía de señalización Hedgehog, acompañada de una sobreexpresión de ABCG2 (Q. Li et al., 2021).

- Ha sido reportado un aumento en los niveles de expresión de ARNm y de proteína de RUNX1 en 35 pares de tejidos de glioma resistentes a temozolomida (TMZ), comparándolos con los sensibles a TMZ (Li W. et al., 2021).
- Nuestro grupo reportó que, en TNBC AR+, la activación de AR induce la expresión de RUNX1 y que ambos podrían trabajar juntos en la sobrevida de las CSC-AR<sup>+</sup> para promover la recurrencia de la enfermedad tras la quimioterapia ya que la inhibición de RUNX1 redujo la viabilidad celular y aumentó la sensibilidad a paclitaxel y enzalutamida (Fernández et al., 2023).
- RUNX1 se sobreexpresa en adenocarcinoma pancreático y está estrechamente relacionado con la resistencia a gemcitabine (GEM). El silenciamiento de RUNX1 pudo reducir la resistencia en una línea celular resistente a GEM, y su inhibidor Ro5-3335 mostró inhibición del crecimiento tumoral cuando se combinó con el tratamiento con GEM en modelos PDX de ratón y xenoinjertos resistentes a GEM (She C. et al., 2023).

También se han publicado papers sobre RUNX2 y resistencia a quimioterapia mencionados en la sección de discusión “Evaluación de la expresión de genes de interés luego del tratamiento con drogas quimioterapéuticas”.

Estas publicaciones apoyan nuestros resultados que indican un rol significativo de RUNX en la resistencia a quimioterapia en TNBC mediante la polarización hacia un fenotipo CSC y la activación de mecanismos de resistencia a drogas como la expresión de *ALDH* y *ABCC1*.

**En conjunto (Figura 58), los resultados presentados a lo largo de esta tesis sugieren que la familia RUNX actúa como un regulador clave en el establecimiento de la resistencia a fármacos en diversas subpoblaciones tumorales generadas a partir líneas celulares humanas TNBC, ofreciendo un potencial blanco terapéutico para terapia combinada con las drogas actuales ofrecidas a pacientes con dicha enfermedad.**



**Figura 58.** Resumen de los resultados obtenidos en esta tesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- A. Recasens, L. Munoz, Targeting cancer cell dormancy. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 128–141 (2019).
- Aaltomaa, S. et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur. J. Cancer* 28, 859–864 (1992).
- Abdallah, E. A., Fanelli, M. F., Souza e Silva, V., Machado Netto, M. C., Gasparini Junior, J. L., Araújo, D. V., ... Chinen, L. T. D. (2016). MRP1 expression in CTCs confers resistance to irinotecan-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 139(4), 890–898. doi:10.1002/ijc.30082
- Abduljabbar, R. et al. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 150, 335–346 (2015).
- Abubaker K, Latifi A, Luwor R, Nazaretian S, Zhu H, Quinn MA, Thompson EW, Findlay JK, Ahmed N. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Mol Cancer.* 2013 Mar 27;12:24. doi: 10.1186/1476-4598-12-24. PMID: 23537295; PMCID: PMC3668985.
- Aceto, N., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D. A. En route to metastasis: circulating tumor cell clusters and epithelial to mesenchymal transition. *Trends Cancer* 1, 44–52 (2015).
- Adhiraj Roy, Shivi Chauhan, Sujata Bhattacharya, Vibhuti Jakhmola, Komal Tyagi, Abha Sachdeva, Abdul Wasai, Supratim Mandal. Runt-related transcription factors in human carcinogenesis: a friend or foe?. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04769-0>
- Adorno-Cruz, V. et al. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res.* 75, 924–929 (2015).
- Aiello, N. M. et al. EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Dev. Cell* 45, 681–695 (2018)
- Akech, J.; Wixted, J.J.; Bedard, K.; Van Der Deen, M.; Hussain, S.; Guise, T.A.; Van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Languino, L.R.; Altieri, D.C.; et al. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: Mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene* 2010, 29, 811–821.
- Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S.(2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 11, 1–9. doi: 10.1186/bcr2333
- Alexandrov, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421 (2013).
- Ali, H. R. et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann. Oncol.* 26, 1488–1493 (2015).
- Allemani, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population- based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 385, 977–1010 (2015).

An, Y., & Ongkeko, W. M. (2009). ABCG2: The key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(12), 1529–1542.

Andriy Marusyk, Michalina Janiszewska, and Kornelia Polyak. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance, 2020. *Cancer Cell* 37.

Annett, S.; Fox, O.W.; Vareslija, D.; Robson, T. Dexamethasone promotes breast cancer stem cells in obese and not lean mice. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2022, 10, e00923. [CrossRef]

Arumugam, A. et al. Silencing growth hormone receptor inhibits estrogen receptor negative breast cancer through ATP-binding cassette sub-family G member 2. *Exp. Mol. Med.* 51, 2 (2019).

Banerji, S., Cibulskis, K., Rangel-Escareno, C., Brown, K. K., Carter, S. L., Frederick, A. M., et al. (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486, 405–409.

Baniwal, S.K.; Khalid, O.; Gabet, Y.; Shah, R.R.; Purcell, D.J.; May, D.; E Kohn-Gabet, A.; Shi, Y.; A Coetze, G.; Frenkel, B. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: Insights into invasiveness and bone metastasis. *Mol. Cancer* 2010, 9, 258.

Bao, S., et al. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756–760.

Barnes, G.L.; Hebert, K.E.; Kamal, M.; Javed, A.; Einhorn, T.A.; Lian, J.B.; Stein, G.S.; Gerstenfeld, L.C. Fidelity of Runx2 Activity in Breast Cancer Cells Is Required for the Generation of Metastases-Associated Osteolytic Disease. *Cancer Res.* 2004, 64, 4506–4513.

Barton, V. N., Christenson, J. L., Gordon, M. A., Greene, L. I., Rogers, T. J., Butterfield, K., Babbs, B., Spoelstra, N. S., D'Amato, N. C., Elias, A., & Richer, J. K. (2017). Androgen Receptor Supports an Anchorage-Independent, Cancer Stem Cell-like Population in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer research*, 77(13), 3455–3466. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3240>

Begicevic RR, Falasca M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 8;18(11):2362. doi: 10.3390/ijms18112362. PMID: 29117122; PMCID: PMC5713331.

Benajiba, Lina, Julien Colle, Maël Heiblig, Sandrine Loron, Juliette Soret-Dulphy, Paul Berchard, Muhube Yazir, Laurent Basset, G Venton, Marie Virginie Larcher, Rafael Daltro de Oliveira, Gaëlle Fossard, Guillaume Martin, Mileidys Perez, Ismael Ceylan, Annick Pelletier, Jean-Jacques Kiladjian and Régis Costello. “Odyssey: A First-in-Human Study of the Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Inhibitor Abd-3001 in Patients with Refractory/Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML) or High-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS).” *Blood* (2024): n. pag.

Bertucci, F. et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature* 569, 560–564 (2019).

Bertucci, P.Y., Quaglino, A., Pozzi, A.G., Kordon, E.C., and Pecci, A. (2010). Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation. *Endocrinology* 151.

Bhat, G.R., Sethi, I., Sadida, H.Q. et al. Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 43, 197–228 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10555-024-10172-z>

Bianchini G, De Angelis C, Licata L, Gianni L. Treatment landscape of triple-negative breast cancer - expanded options, evolving needs. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022 Feb;19(2):91-113. doi: 10.1038/s41571-021-00565-2. Epub 2021 Nov 9. PMID: 34754128.

Blauž A, Rychlik B. Drug-selected cell line panels for evaluation of the pharmacokinetic consequences of multidrug resistance proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2017 Mar-Apr;84:57-65. doi: 10.1016/j.vascn.2016.11.001. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27838457.

Blyth K, Cameron ER and Neil JC: The RUNX genes: Gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 376-387, 2005.

Blyth K, Vaillant F, Jenkins A, McDonald L, Pringle MA, Huser C, Stein T, Neil J & Cameron ER (2010) Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood Cells Mol Dis* 45, 117–123.

Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008, 42, 606–615.

Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801 (2014).

Borst P. Looking back at multidrug resistance (MDR) research and ten mistakes to be avoided when writing about ABC transporters in MDR. *FEBS Lett* 2020;594:4001-11. DOI PubMed

Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(2):128–34

Bragado, P. et al. TGF $\beta$ 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF $\beta$ -RIII and p38 $\alpha/\beta$  signalling. *Nat. Cell Biol.* 15, 1351–1361 (2013).

Bravo, J.; Li, Z.; A Speck, N.; Warren, A.J. The leukemia-associated AML1 (Runx1)–CBF $\beta$  complex functions as a DNA-induced molecular clamp. *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8, 371–378.

Britton, K. M. et al. Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett.* 323, 97–105 (2012).

Brock, A., Chang, H. & Huang, S. Non-genetic heterogeneity—a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat. Rev. Genet.* 10, 336–342 (2009).

Brown, M. S., Abdollahi, B., Wilkins, O. M., Lu, H., Chakraborty, P., Ognjenovic, N. B., ...Pattabiraman, D. R. (2022). Phenotypic heterogeneity driven by plasticity of the intermediate EMT state governs disease progression and metastasis in breast cancer. *Science Advances* 8(31), eabj8002. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj8002>.

Brown, S. D. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* 24, 743–750 (2014).

Browne, G., Dragon, J. A., Hong, D., Messier, T. L., Gordon, J. A., Farina, N. H., et al. (2016). MicroRNA 378-mediated suppression of Runx1 alleviates the aggressive phenotype of triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Tumour Biology*, 37(7), 8825–8839.

Browne, G., Taipaleenmaki, H., Bishop, N. M., Madasu, S. C., Shaw, L. M., Van Wijnen, A. J., et al. (2015). Runx1 is associated with breast cancer progression in MMTV-PyMT transgenic mice and its depletion in vitro inhibits migration and invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 230, 2522–2532.

Brusgard, J.L.; Choe, M.; Chumsri, S.; Renoud, K.; MacKerell, A.D., Jr.; Sudol, M.; Passaniti, A. RUNX2 and TAZ-dependent signaling pathways regulate soluble E-Cadherin levels and tumorsphere formation in breast cancer cells. *Oncotarget* 2015, 6, 28132–28150.

Bryant, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913–917 (2005).

Bulfoni, M., Gerratana, L., Del Ben, F. et al. In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis. *Breast Cancer Res* 18, 30 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0687-3>

Buonomo, O. C. et al. New insights into the metastatic behavior after breast cancer surgery, according to well-established clinicopathological variables and molecular subtypes. *PLOS ONE* 12, e0184680 (2017).

Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua S, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0432

Buschmann, D.; Gonzalez, R.; Kirchner, B.; Mazzone, C.; Pfaffl, M.W.; Schelling, G.; Steinlein, O.; Reithmair, M. Glucocorticoid receptor overexpression slightly shifts microRNA expression patterns in triple-negative breast cancer. *Int. J. Oncol.* 2018, 52, 1765–1776.

Bushweller, J.H.; Huang, X.; Peng, J.W.; Speck, N.A. Solution structure of core binding factor  $\beta$  and map of the CBF $\alpha$  binding site. *Nat. Struct. Biol.* 1999, 6, 624–627. [CrossRef]

Butturini, E.; Carcereri de Prati, A.; Boriero, D.; Mariotto, S. Tumor Dormancy and Interplay with Hypoxic Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4305. <https://doi.org/10.3390/ijms20174305>

Butz, H.; Patocs, A. Mechanisms behind context-dependent role of glucocorticoids in breast cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2022, 41, 803–832.

Cai, Z., de Brujin, M., Ma, X., Dortland, B., Luteijn, T., Downing, J. R. and Dzierzak, E. (2000). Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 13, 423-431. doi:10.1016/S1074-7613(00)00042-X

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490, 61–70.

Cardoso F, Paluch-Shimon S, Schumacher-Wulf E, Matos L, Gelmon K, Aapro MS, Bajpai J, Barrios CH, Bergh J, Bergsten-Nordström E, Biganzoli L, Cardoso MJ, Carey LA, Chavez-MacGregor M, Chidebe R, Cortés J, Curigliano G, Dent RA, El Saghir NS, Eniu A, Fallowfield L, Francis PA, Franco Millan SX, Gilchrist J, Gligorov J, Gradishar WJ, Haidinger R, Harbeck N, Hu X, Kaur R, Kiely B, Kim SB, Koppikar S, Kuper-Hommel MJ, Lecouvet FE, Mason G, Mertz SA, Mueller V, Myerson C, Neciosup S, Offersen BV, Ohno S, Pagani O, Partridge AH, Penault-Llorca F, Prat A, Rugo HS, Senkus E, Sledge GW, Swain SM, Thomssen C, Vorobiof DA, Vuylsteke P, Wiseman T, Xu B, Costa A, Norton L, Winer EP. 6th and 7th International consensus guidelines for the management of advanced breast cancer

(ABC guidelines 6 and 7). *Breast*. 2024 Aug;76:103756. doi: 10.1016/j.breast.2024.103756. Epub 2024 May 28. PMID: 38896983; PMCID: PMC11231614.

Carnero, A.; Garcia-Mayea, Y.; Mir, C.; Lorente, J.; Rubio, I.T.; ME, L.L. The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer Treat. Rev.* 2016, 49, 25–36.

Castro-Giner, F. & Aceto, N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Med.* 12, 31 (2020).

Chabon, J. J. et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat. Commun.* 7, 11815 (2016).

Chalakur-Ramireddy, Naveen K.R. and Suresh Babu Pakala. “Combined drug therapeutic strategies for the effective treatment of Triple Negative Breast Cancer.” *Bioscience Reports* 38 (2018): n. pag.

Challen, G. A. and Goodell, M. A. (2010). Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 38, 403-416. doi:10.1016/j.exphem.2010.02.011

Charafe-Jauffret, E. et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* 69, 1302–1313 (2009).

Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E & Speck NA (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887–891.

Chen N, Matossian M, Saha P, Rampurwala M, Kamaraju S, Hahn O, Howard FM, Fleming GF, Freeman JQ, Garrison T, Conzen S, Nanda R, Stringer-Reasor EM. A randomized phase II trial of nab-paclitaxel with or without mifepristone for advanced triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2025 Feb 10. doi: 10.1007/s10549-025-07626-5. Epub ahead of print. PMID: 39928262.

Chen X, Tu J, Yang M, Wang Y, Liu B, Qiu H, Yuan X. RUNX1-MUC13 Interaction Activates Wnt/β-Catenin Signaling Implications for Colorectal Cancer Metastasis. *Int J Biol Sci.* 2024 Sep 16;20(12):4999-5026. doi: 10.7150/ijbs.98396. PMID: 39309442; PMCID: PMC11414392.

Chen Z, Lan X, Wu D, Sunkel B, Ye Z, Huang J, Liu Z, Clinton SK, Jin VX, Wang Q. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer. *Nat Commun.* 2015 Sep 16;6:8323. doi: 10.1038/ncomms9323. PMID: 26374485; PMCID: PMC4573460.

Chen, Y.; Song, J.; Jiang, Y.; Yu, C.; Ma, Z. Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015, 8, 11287–11295.

Chimge NO, Little GH, Baniwal SK, Adisetiyo H, Xie Y, Zhang T, O’Laughlin A, Liu ZY, Ulrich P, Martin A, Mhawech Fauceglia P, Ellis MJ, Tripathy D, Groshen S, Liang C, Li Z, Schones DE, Frenkel B. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and beta-catenin activation in ER-positive breast cancer. *Nat Commun.* 2016;7:10751.

Chimge, N. O., Little, G. H., Baniwal, S. K., Adisetiyo, H., Xie, Y., Zhang, T., et al. (2016). RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and beta catenin activation in ER-positive breast cancer. *Nature Communications*, 7, 10751.

Chimge, N.-O.; Baniwal, S.K.; Little, G.H.; Chen, Y.-B.; Kahn, M.; Tripathy, D.; Borok, Z.; Frenkel, B. Regulation of breast cancer metastasis by Runx2 and estrogen signaling: The role of SNAI2. *Breast Cancer Res.* 2011, 13, R127.

Chimge, N.-O.; Baniwal, S.K.; Luo, J.; Coetze, S.; Khalid, O.; Berman, B.P.; Tripathy, D.; Ellis, M.J.; Frenkel, B. Opposing Effects of Runx2 and Estradiol on Breast Cancer Cell Proliferation: In Vitro Identification of Reciprocally Regulated Gene Signature Related to Clinical Letrozole Responsiveness. *Clin. Cancer Res.* 2012, 18, 901–911.

Chimge, N.-O.; Frenkel, B. The RUNX family in breast cancer: Relationships with estrogen signaling. *Oncogene* 2013, 32, 2121–2130.

Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2008). Recent advances in cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 18(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.017>

Chuang LS, Ito K and Ito Y: RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *Int J Cancer* 132: 1260-1271, 2013.

Chung, W., Eum, H., Lee, HO. et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun* 8, 15081 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms15081>

Clara, J. A., Monge, C., Yang, Y. & Takebe, N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells - a clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 204–232 (2020).

Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20: 1223–1229.

Colditz, G. A., Sellers, T. A. & Trapido, E. Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 6, 75–83 (2006).

Conway, M.E.; McDaniel, J.M.; Graham, J.M.; Guillen, K.P.; Oliver, P.G.; Parker, S.L.; Yue, P.; Turkson, J.; Buchsbaum, D.J.; Welm, B.E.; et al. STAT3 and GR Cooperate to Drive Gene Expression and Growth of Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *CancerRes.* 2020, 80, 4355–4370.

Cortes, J., Cescon, D.W., Rugo, H.S., Nowecki, Z., Im, S.A., Yusof, M.M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C.H., Holgado, E., et al. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 396, 1817–1828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32531-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32531-9)

Costa, C. et al. Analysis of a real-world cohort of metastatic breast cancer patients shows circulating tumor cell clusters (CTC-clusters) as predictors of patient outcomes. *Cancers* 12, 1111 (2020).

Creighton, C. J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 13820–13825 (2009).

Creighton, C. J., Chang, J. C. & Rosen, J. M. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) in tumor initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 253–260 (2010).

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–791.

Croker AK, Rodriguez-Torres M, Xia Y, Pardhan S, Leong HS, Lewis JD, Allan AL. Differential Functional Roles of ALDH1A1 and ALDH1A3 in Mediating Metastatic Behavior and Therapy Resistance of Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep 22;18(10):2039. doi: 10.3390/ijms18102039. PMID: 28937653; PMCID: PMC5666721.

Curtis, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346–352 (2012).

Czekay RP, Cheon DJ, Samarakoon R, Kutz SM, Higgins PJ. Cancer-Associated Fibroblasts: Mechanisms of Tumor Progression and Novel Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 27;14(5):1231. doi: 10.3390/cancers14051231. PMID: 35267539; PMCID: PMC8909913.

D'Oronzo, S., Brown, J. & Coleman, R. The role of biomarkers in the management of bone-homing malignancies. *J. Bone Oncol.* 9, 1–9 (2017).

Dagogo-Jack, I., Shaw, A. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 81–94 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>

Dallas, N.A.; Xia, L.; Fan, F.; Gray, M.J.; Gaur, P.; van Buren, G., 2nd; Samuel, S.; Kim, M.P.; Lim, S.J.; Ellis, L.M. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009, 69, 1951–1957.

D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, Roz L, Bertolini G. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol.* 2020 Feb;60:351-361. doi: 10.1016/j.semcan.2019.08.019. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31454672.

Damen MPF, van Rheenen J, Scheele CLGJ. Targeting dormant tumor cells to prevent cancer recurrence. *FEBS J.* 2021 Nov;288(21):6286-6303. doi: 10.1111/febs.15626. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33190412. Massagué, J. & Ganesh, K. Metastasis-initiating cells and ecosystems. *Cancer Discov.* 11, 971–994 (2021).

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A.D., Murray, C.J., and Ezzati, M.; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers) (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2).

Darby RA, Callaghan R, McMahon RM. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. *Curr Drug Metab* 2011;12:722-31. DOI PubMed

Date Y, Taniuchi I, Ito K. Oncogenic Runx1-Myc axis in p53-deficient thymic lymphoma. *Gene.* 2022 Apr 20;819:146234. doi: 10.1016/j.gene.2022.146234. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114276.

Dawson SJ, Oscar M Rueda, Samuel Aparicio and Carlos Caldas. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *The EMBO Journal* VOL 32 NO 5 2013.

De Albuquerque A, Kubisch I, Ernst D, et al. Development of a molecular multimarker assay for the analysis of circulating tumor cells in adenocarcinoma patients. *Clin Lab.* 2012; 58:373–84. [PubMed: 22783565]

De Angelis, M. L., Francescangeli, F., La Torre, F., & Zeuner, A. (2019). Stem cell plasticity and dormancy in the development of cancer therapy resistance. *Frontiers in Oncology*, 9, 626. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00626>

De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6302–6309.

De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013 Feb;13(2):97-110. doi: 10.1038/nrc3447. PMID: 23344542.

De Wild SR, de Munck L, Simons JM, et al. De-escalation of radiotherapy after primary chemotherapy in cT1-2N1 breast cancer (RAPCHEM; BOOG 2010-03): 5-year follow-up results of a Dutch, prospective, registry study. *Lancet Oncol.* 2022;23(9):1201-1210.

Dean, M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(1), 3–9.

Deltcheva E, Nimmo R. RUNX transcription factors at the interface of stem cells and cancer. *Biochem J.* 2017 May 10;474(11):1755-1768. doi: 10.1042/BCJ20160632. PMID: 28490659.

Demeule M, Charfi C, Currie J-C, et al. TH1902, a new docetaxel-peptide conjugate for the treatment of sortilin-positive triple-negative breast cancer. *Cancer Sci.* 2021;112:4317–4334. <https://doi.org/10.1111/cas.15086>

Deng Y, Bai H, Hu H. rs11671784 G/A variation in miR-27a decreases chemo-sensitivity of bladder cancer by decreasing miR-27a and increasing the target RUNX-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 6;458(2):321-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.109. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25656571.

Denkert, C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 33, 983–991 (2015).

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA (2007) Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1):4429–4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045

Dhadve AC, Hari K, Rekhi B, Jolly MK, De A, Ray P. Decoding molecular interplay between RUNX1 and FOXO3a underlying the pulsatile IGF1R expression during acquirement of chemoresistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(6): 165754.

Dhimolea E, de Matos Simoes R, Kansara D, Al'Khafaji A, Bouyssou J, Weng X, Sharma S, Raja J, Awate P, Shirasaki R, Tang H, Glassner BJ, Liu Z, Gao D, Bryan J, Bender S, Roth J, Scheffer M, Jeselsohn R, Gray NS, Georgakoudi I, Vazquez F, Tsherniak A, Chen Y, Welm A, Duy C, Melnick A, Bartholdy B, Brown M, Culhane AC, Mitsiades CS. An Embryonic Diapause-like Adaptation with Suppressed Myc Activity Enables Tumor Treatment Persistence. *Cancer Cell.* 2021 Feb 8;39(2):240-256.e11. doi: 10.1016/j.ccr.2020.12.002. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33417832; PMCID: PMC8670073.

Diana C. West, Masha Kocherginsky, Eva Y. Tonsing-Carter, D. Nesli Dolcen, David J. Hosfield<sup>4</sup>, Ricardo R. Lastra, Jason P. Sinnwell, Kevin J. Thompson, Kathleen R. Bowie, Ryan V. Harkless, Maxwell N. Skor, Charles F. Pierce, Sarah C. Style, Caroline R. Kim, Larischa de Wet, Geoffrey L. Greene, Judy C. Boughey, Matthew P. Goetz<sup>7,8</sup>, Krishna R. Kalari, Liewei Wang, Gini F. Fleming, Balazs Gyorffy, and Suzanne D. Conzen. Discovery of a Glucocorticoid Receptor (GR) Activity Signature Using Selective GR Antagonism in ER-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*; 24(14) July 15, 2018.

Dong J, Qin Z, Zhang WD, et al. Medicinal chemistry strategies to discover P-glycoprotein inhibitors: an update. *Drug Resist Updat* 2020;49:100681. DOI PubMed

Dos Santos RV, da Silva LM (2013) A Possible Explanation for the Variable Frequencies of Cancer Stem Cells in Tumors. *PLoS ONE* 8(8): e69131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069131>

Dowdy CR, Xie R, Frederick D, Hussain S, Zaidi SK, Vradii D, Javed A, Li X, Jones SN, Lian JB, et al: Definitive hematopoiesis requires Runx1 C-terminal-mediated subnuclear targeting and transactivation. *Hum Mol Genet* 19: 1048-1057, 2010.

Duan, Z., Choy, E., Jimeno, J.M. et al. Diverse cross-resistance phenotype to ET-743 and PM00104 in multi-drug resistant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 1121–1129 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0843-2>

E.M. Stringer-Reasor, et al., Glucocorticoid receptor activation inhibits chemotherapy-induced cell death in high-grade serous ovarian carcinoma, *Gynecol Oncol* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.033>

Eldaly, S., Gouhar, S., & Abo-elfadl, M. (2022). The Influence of 5-Fluorouracil on Drug Transporters is a Dose Dependent Effect Mediated by Altered Expression of miRNAs. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(8), 737-748. doi: 10.21608/ejchem.2022.132340.5844

Eliades, A., Wareing, S., Marinopoulou, E., Fadlullah, M. Z. H., Patel, R., Grabarek, J. B., Plusa, B., Lacaud, G. and Kouskoff, V. (2016). The Hemogenic competence of endothelial progenitors is restricted by Runx1 silencing during embryonic development. *Cell Rep*. 15, 2185-2199. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.001

Ellis, M.J.; Ding, L.; Shen, D.; Luo, J.; Suman, V.J.; Wallis, J.W.; Van Tine, B.A.; Hoog, J.; Goiffon, R.J.; Goldstein, T.C.; et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012, 486, 353–360.

Enderling Heiko. Cancer stem cells: small subpopulation or evolving fraction?. *Integr. Biol.*, 2015, 7, 14

Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T. and Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 275, 8695-8702. doi:10.1074/jbc.275.12.8695

Enomoto, H., Furuichi, T., Zanma, A., Yamana, K., Yoshida, C., Sumitani, S., Yamamoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M. and Komori, T. (2004). Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J. Cell. Sci.* 117, 417-425. doi:10.1242/jcs.00866

Fabisiewicz, A. & Grzybowska, E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med. Oncol.* 34, 12 (2017).

Facundo Luis Couto. "Estudio de la regulación de KLF4 por RUNX1 en un modelo experimental de células madre de cáncer de mama triple negativo". Dirección: Natalia Rubinstein.

Fanfone, D. et al. Confined migration promotes cancer metastasis through resistance to anoikis and increased invasiveness. *Elife* 11, e73150 (2022).

Farabaugh, S. M., Boone, D. N. & Lee, A. V. Role of IGF1R in breast cancer subtypes, stemness, and lineage differentiation. *Front Endocrinol.* 6, 59 (2015).

Farmer, H. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921 (2005).

Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, et al. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R76. [PubMed: 18793387]

Fengxu Lv, Wentao Si, Xiaodan Xu, Xiaogang He, Ying Wang, Yetian Li, Feifei Li. RUNX2 prompts triple negative breast cancer drug resistance through TGF- $\beta$  pathway regulating breast cancer stem cells. *Neoplasia* 48 (2024) 100967

Fernández, N. B., Sosa, S. M., Roberts, J. T., Recouvreux, M. S., Rocha-Viegas, L., Christenson, J. L., Spoelstra, N. S., Couto, F. L., Raimondi, A. R., Richer, J. K., & Rubinstein, N. (2023). RUNX1 Is Regulated by Androgen Receptor to Promote Cancer Stem Markers and Chemotherapy Resistance in Triple Negative Breast Cancer. *Cells*, 12(3), 444. <https://doi.org/10.3390/cells12030444>

Ferrari P, Scatena C, Ghilli M, Bargagna I, Lorenzini G, Nicolini A. Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 31;23(3):1665. doi: 10.3390/ijms23031665. PMID: 35163586; PMCID: PMC8836182.

Ferrari, N.; Mohammed, Z.M.A.; Nixon, C.; Mason, S.M.; Mallon, E.; McMillan, N.C.; Morris, J.S.; Cameron, E.R.; Edwards, J.; Blyth, K. Expression of RUNX1 Correlates with Poor Patient Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS ONE* 2014, 9, e100759.

França et al. Cellular adaptation to cancer therapy along a resistance continuum. *Nature*, 2024

Francisco, L.M.; Salinas, V.H.; Brown, K.E.; Vanguri, V.K.; Freeman, G.J.; Kuchroo, V.K.; Sharpe, A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 3015–3029.

Friboulet, L., Soria, J. C. & Olaussen, K. A. The "Guardian of the Genome"-An Old Key to Unlock the ERCC1 Issue. *Clin. Cancer Res.* 25, 2369–2371 (2019).

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 3(5), 362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>

Fritz AJ, Hong D, Boyd J, et al. RUNX1 and RUNX2 transcription factors function in opposing roles to regulate breast cancer stem cells. *J Cell Physiol.* 2020;1–12. <https://doi.org/10.1002/jcp.29625>

Fu N, Lindeman GJ, Visvader JE. The mammary stem cell hierarchy. *Curr Top Dev Biol* (2014) 107:133–60. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00005-6

Fujita, Y., Nishimura, M., Taniwaki, M., Abe, T. and Okuda, T. (2001). Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1248-1255. doi:10.1006/bbrc.2001.4513

Fukamachi H: Runx3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals. *Dev Growth Differ* 48: 1-13, 2006.

Fulda, S. (2015). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 84–88.

Gabos Z, Thoms J, Ghosh S, Hanson J, Deschenes J, Sabri S, Abdulkarim B (2010) The association between biological subtype and locoregional recurrence in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 124(1):187–194. doi:10.1007/s10549-010-1135-1

Gazzaniga P, Naso G, Gradilone A, Cortesi E, Gandini O, Gianni W, Fabbri MA, Vincenzi B, di Silverio F, Frati L, Agliano AM, Cristofanilli M (2010) Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells: prognostic and predictive value in epithelial tumors. *Int J Cancer* 126(10):2437–2447. doi:10.1002/ijc.24953

Genna, A. et al. EMT-Associated heterogeneity in circulating tumor cells: sticky friends on the road to metastasis. *Cancers* 12, 1632 (2020).

Geter PA, Ernlund AW, Bakogianni S, Alard A, Arju R, Giashuddin S, Gadi A, Bromberg J and Schneider RJ. Hyperactive mTOR and MNK1 phosphorylation of eIF4E confer tamoxifen resistance and estrogen independence through selective mRNA translation reprogramming. *Genes Dev* 31: 2235-2249, 2017.

Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* (2013) 155(4):750–64. doi:10.1016/j.cell.2013.10.029

Ginsburg, O. et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet* 389, 847–860 (2017).

Giricz O, Mo Y, Dahlman KB, Cotto-Rios XM, Vardabasso C, Nguyen H, Matusow B, Bartenstein M, Polishchuk V, Johnson DB, Bhagat TD, Shellooe R, Burton E, Tsai J, Zhang C, Habets G, Greally JM, Yu Y, Kenny PA, Fields GB, Pradhan K, Stanley ER, Bernstein E, Bollag G, Gavathiotis E, West BL, Sosman JA, Verma AK. The RUNX1/IL-34/CSF-1R axis is an autocrinally regulated modulator of resistance to BRAF-V600E inhibition in melanoma. *JCI Insight*. 2018;3(14):4157.

Gkountela, S. & Aceto, N. Stem-like features of cancer cells on their way to metastasis. *Biol. Direct* 11, 33 (2016).

Glen, C. D. & Dubrova, Y. E. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 2984–2988 (2012).

Gluz O, et al. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009;20(12):1913–27.

Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E, Gandini O, Vincenzi B, Saltarelli R, Chiapparino E, Spremberg F, Cristofanilli M, Frati L, Agliano AM, Gazzaniga P (2011) Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. *Ann Oncol* 22(1):86–92

Groves, S. M., Panchy, N., Tyson, D. R., Harris, L. A., Quaranta, V., & Hong, T. (2023). Involvement of epithelial–mesenchymal transition genes in small cell lung cancer phenotypic plasticity. *Cancers* 15(5), 1477. <https://doi.org/10.3390/cancers15051477>

Guestini, F. et al. Impact of Topoisomerase IIalpha, PTEN, ABCC1/MRP1, and KI67 on triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 173, 275–288 (2019).

Gu-Trantien, C. et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123, 2873–2892 (2013).

Halperin, C.; Hey, J.; Weichenhan, D.; Stein, Y.; Mayer, S.; Lutsik, P.; Plass, C.; Scherz-Shouval, R. Global DNA Methylation Analysis of Cancer-Associated Fibroblasts Reveals Extensive Epigenetic Rewiring Linked with RUNX1 Upregulation in Breast Cancer Stroma. *Cancer Res.* 2022, 82, 4139–4152.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the Angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7).

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674

Hankinson, S.E., Colditz, G.A., and Willett, W.C. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res.* 6, 213–218. <https://doi.org/10.1186/bcr921>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5, 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Hashim, D., Boffetta, P., La Vecchia, C., Rota, M., Bertuccio, P., Malvezzi, M., and Negri, E. (2016). The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann. Oncol.* 27, 926–933. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw027>.

Hata, A. N., Niederst, M. J., Archibald, H. L., Gomez-Caraballo, M., Siddiqui, F. M., Mulvey, H. E., Maruvka, Y. E., Ji, F., Bhang, H. E., Krishnamurthy Radhakrishna, V., Siravegna, G., Hu, H., Raoof, S., Lockerman, E., Kalsy, A., Lee, D., Keating, C. L., Ruddy, D. A., Damon, L. J., Crystal, A. S., ... Engelman, J. A. (2016). Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature medicine*, 22(3), 262–269. <https://doi.org/10.1038/nm.4040>

Hatina, J. The dynamics of cancer stem cells. *Neoplasma* 2012, 59, 700–707.

Herrera, R.A.; Deshpande, K.; Martirosian, V.; Saatian, B.; Julian, A.; Eisenbarth, R.; Das, D.; Iyer, M.; Neman, J. Cortisol promotes breast-to-brain metastasis through the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Cancer Rep.* 2022, 5, e1351. [CrossRef] [PubMed]

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76.

Hessler LK, Molitoris JK, Rosenblatt PY, et al. Factors influencing management and outcome in patients with occult breast cancer with axillary lymph node involvement: analysis of the National Cancer Database. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(10):2907-2914

Hinohara, K., Wu, H.J., Vigneau, S., McDonald, T.O., Igarashi, K.J., Yamamoto, K.N., Madsen, T., Fassl, A., Egri, S.B., Papanastasiou, M., et al. (2018). KDM5 histone demethylase activity links cellular transcriptomic heterogeneity to therapeutic resistance. *Cancer Cell* 34, 939–953.e9.

Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, et al., 2013, Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 155: 934–947. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>

Hojman, E., Rocha-Viegas, L., Kalko, S.G., Rubinstein, N., Morales-Ruiz, M., de Kier Joffé, E.B., Kordon, E.C., and Pecci, A. (2012). Glucocorticoid alternative effects on proliferating and differentiated mammary epithelium are associated to opposite regulation of cell-cycle inhibitor expression. *Journal of Cellular Physiology* 227.

Holmgren, L., O'Reilly, M. S., & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1(2), 149–153. <https://doi.org/10.1038/nm0295-149>

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al.: The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008;10:R53

Hong D, Fritz AJ, Finstad KH, Fitzgerald MP, Weinheimer A, Viens AL, Ramsey J, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Suppression of breast cancer stem cells and tumor growth by the RUNX1 transcription factor. *Mol Cancer Res*. 2018;16(12):1952–64.

Hong D, Fritz AJ, Gordon JA, et al. RUNX1-dependent mechanisms in biological control and dysregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 2018;1–13. <https://doi.org/10.1002/jcp.27841>

Hong D, Fritz AJ, Gordon JA, Tye CE, Boyd JR, Tracy KM, Frietze SE, Carr FE, Nickerson JA, Van Wijnen AJ, Imbalzano AN, Zaidi SK, Lian JB, Stein GS. RUNX1-dependent mechanisms in biological control and dysregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8597-8609. doi: 10.1002/jcp.27841. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30515788; PMCID: PMC6395522.

Hong, D., Messier, T. L., Tye, C. E., Dobson, J. R., Fritz, A. J., Sikora, K. R., ...Stein, G. S. (2017). Runx1 stabilizes the mammary epithelial cell phenotype and prevents epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 8(11), 17610–17627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15381>

Horak CE, Pusztai L, Xing G, Trifan OC, Saura C, Tseng L-M, et al. Biomarker analysis of neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or Paclitaxel in early-stage breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19:1587–1595. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1359

Hsu, H. H., Chen, M. C., Baskaran, R., Lin, Y. M., Day, C. H., Lin, Y. J., Tu, C. C., Vijaya Padma, V., Kuo, W. W., & Huang, C. Y. (2018). Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 233(7), 5458–5467. <https://doi.org/10.1002/jcp.26406>

Huang C-P, Tsai M-F, Chang T-H, Tang W-C, Chen S-Y, Lai H-H, et al. ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett.* 2013;328(1):144–51

Huang Q, Wang Y, Chen X, Wang Y, Li Z, Du S, Wang L, Chen S. Nanotechnology-Based Strategies for Early Cancer Diagnosis Using Circulating Tumor Cells as a Liquid Biopsy. *Nanotheranostics.* 2018 Jan 1;2(1):21-41. doi: 10.7150/ntno.22091. PMID: 29291161; PMCID: PMC5743836.

Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Jul 9;6(1):254. doi: 10.1038/s41392-021-00648-7. PMID: 34238917; PMCID: PMC8266832.

Huang, G.; Shigesada, K.; Ito, K.; Wee, H.; Yokomizo, T.; Ito, Y. Dimerization with PEBP2 $\beta$  protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J.* 2001, 20, 723–733.

Huang, S. (2021). The logic of cancer treatment: why it is so hard to cure cancer. In B. Strauss et al. (Eds.), *Rethinking cancer: A new paradigm for the post-genomics era* (pp. 63–128). MIT Press Book.

Hudis and Gianni. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need, *Oncologist* 16 (Suppl. 1) (2011) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2011-S1-01>.

Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini

Illendula, A., Gilmour, J., Grembecka, J., Tirumala, V. S. S., Boulton, A., Kuntimaddi, A., Schmidt, C., Wang, L., Pulikkan, J. A., Zong, H., Parlak, M., Kuscu, C., Pickin, A., Zhou, Y., Gao, Y., Mishra, L., Adli, M., Castilla, L. H., Rajewski, R. A., Janes, K. A., ... Bushweller, J. H. (2016). Small Molecule Inhibitor of CBF $\beta$ -RUNX Binding for RUNX Transcription Factor Driven Cancers. *EBioMedicine*, 8, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.032>

Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N. et al. (1999). Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.* 214, 279–290. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<279::AID-AJA1>3.0.CO;2-W

Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N, Iseda T, Kawaguchi S, Ogawa M, Bae SC, et al: Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* 5: 946-954, 2002.

Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 41–55 (2016).

Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., and Okamoto, K. (2017) Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications, *Cancer Sci.*, 108, 283-289, <https://doi.org/10.1111/cas.13155>.

Ito K, Lim AC, Salto-Tellez M, et al. RUNX3 attenuates b-catenin/T cell factors in intestinal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008;14:226–37.

Ito Y. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes. *Adv Cancer Res* 2008;99:33–76.

Ito, Y.; Bae, S.C.; Chuang, L.S. The RUNX family: Developmental regulators in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 81–95.

Janes KA. RUNX1 and its understudied role in breast cancer. *Cell Cycle* 2011; 10: 3461–3465.

Jaramillo AC, Saig FA, Cloos J, Jansen G, Peters GJ. How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resistance* 2018;1:6-29.

Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB, et al: Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci* 113: 2221-2231, 2000.

Javed, A.; Barnes, G.L.; Pratap, J.; Antkowiak, T.; Gerstenfeld, L.C.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Lian, J.B.; Stein, G.S. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 1454–1459.

Jeselsohn R, Cornwell M, Pun M, Buchwalter G, Nguyen M, Bango C, Huang Y, Kuang Y, Paweletz C, Fu X, et al: Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E4482-E4491, 2017.

Jianglong Xu, Jia Song, Menglin Xiao, Changsheng Wang, Qisong Zhang, Xiaoye Yuan & Shaohui Tian (2021) RUNX1 (RUNX family transcription factor 1), a target of microRNA miR-128-3p, promotes temozolomide resistance in glioblastoma multiform by upregulating multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), *Bioengineered*, 12:2, 11768-11781, DOI: 10.1080/21655979.2021.2009976

John, S., Johnson, T.A., Sung, M.H., Biddie, S.C., Trump, S., Koch-Paiz, C.A., Davis, S.R., Walker, R., Meltzer, P.S., and Hager, G.L. (2009). Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action. *Endocrinology* 150.

Julio A. Aguirre-Ghiso (2006) The Problem of Cancer Dormancy: Understanding the Basic Mechanisms and Identifying Therapeutic Opportunities, *Cell Cycle*, 5:16, 1740-1743, DOI: 10.4161/cc.5.16.3165

K. Stoletov, et al., Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 904–913.

Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, et al. Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J Virol* 1990;64:4808–19.

Kandoth, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339 (2013).

Kang, Y.; Siegel, P.M.; Shu, W.; Drobniak, M.; Kakonen, S.M.; Cordón-Cardo, C.; Guise, T.A.; Massagué, J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003, 3, 537–549.

Kasimir-Bauer, S., Hoffmann, O., Wallwiener, D., Kimmig, R., and Fehm, T. (2012). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 14:R15. doi: 10.1186/bcr3099

Kendrick, H., Regan, J. L., Magnay, F. A., Grigoriadis, A., Mitsopoulos, C., Zvelebil, M., & Smalley, M. J. (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics*, 9, 591.

Kent, W.J.; Sugnet, C.W.; Furey, T.S.; Roskin, K.M.; Pringle, T.H.; Zahler, A.M.; Haussler, D. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002, 12, 996–1006.

Kevin Roarty and Gloria V. Echeverria. Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis. *Frontiers in Oncology*, March 2021, Volume 11, Article 645698

Khalid Abubaker, Ardian Latifi, Rod Luwor, Simon Nazaretian, Hongjian Zhu, Michael A Quinn, Erik W Thompson, Jock K Findlay and Nuzhat Ahmed. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Abubaker et al. Molecular Cancer* 2013, 12:24 <http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/24>

Khalid, O.; Baniwal, S.K.; Purcell, D.J.; Leclerc, N.; Gabet, Y.; Stallcup, M.R.; Coetze, G.A.; Frenkel, B. Modulation of Runx2 Activity by Estrogen Receptor- $\alpha$ : Implications for Osteoporosis and Breast Cancer. *Endocrinology* 2008, 149, 5984–5995.

Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, Rodriguez-Tirado C, Moritsch S, Martinez AR, Miles B, Farias E, Mezei M, Nobre AR, Singh D, Kale N, Sproll KC, Sosa MS, Aguirre-Ghiso JA. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. *J Exp Med.* 2022 Jan 3;219(1):e20210836. doi: 10.1084/jem.20210836. Epub 2021 Nov 23. PMID: 34812843; PMCID: PMC8614154.

Khan AS, Campbell KJ, Cameron ER, Blyth K. The RUNX/CBF $\beta$  Complex in Breast Cancer: A Conundrum of Context. *Cells.* 2023 Feb 16;12(4):641. doi: 10.3390/cells12040641. PMID: 36831308; PMCID: PMC9953914.

Khan, S. U., Fatima, K., & Malik, F. (2022). Understanding the cell survival mechanism of anoikis-resistant cancer cells during different steps of metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 39(5), 715–726. <https://doi.org/10.1007/s10585-022-10172-9>

Khan, S.U., Rayees, S., Sharma, P. et al. Targeting redox regulation and autophagy systems in cancer stem cells. *Clin Exp Med* 23, 1405–1423 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00955-5>

Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandrasekhar R, Jabbour M, Deleo A, Ferrone S, Wang Y, Wang X. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol.* 2012 Mar;25(3):388–97. doi: 10.1038/modpathol.2011.172. Epub 2011 Nov 11. Erratum in: *Mod Pathol.* 2012 Jun;25(6):917. Chandrasekhar, Rameela [corrected to Chandrasekhar, Rameela]. PMID: 22080062; PMCID: PMC3426278.

Kim RS, Avivar-Valderas A, Estrada Y, Bragado P, Sosa MS, Aguirre-Ghiso JA, Segall JE. Dormancy signatures and metastasis in estrogen receptor positive and negative breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(4):e35569. doi: 10.1371/journal.pone.0035569. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22530051; PMCID: PMC3329481.

Kim, A., Jang, M. H., Lee, S. J. & Bae, Y. K. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in triple-negative breast cancer. *J. Breast Cancer* 20, 150–159 (2017).

Knoechel, B., Roderick, J.E., Williamson, K.E., Zhu, J., Lohr, J.G., Cotton, M.J., Gillespie, S.M., Fernandez, D., Ku, M., Wang, H., et al. (2014). An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 46, 364–370.

Knutson TP, Truong TH, Ma S, Brady NJ, Sullivan ME, Raj G, Schwertfeger KL and Lange CA: Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs. *J Hematol Oncol* 10: 89, 2017.

Koebel, C. M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907 (2007).

Kof, J. L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 2942–2955.

Koirala, M.; DiPaola, M. Overcoming Cancer Resistance: Strategies and Modalities for Effective Treatment. *Biomedicines* 2024, 12, 1801. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081801>

Komori T: Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 21: 193-197, 2003.

Komori, T. (2018). Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem. Cell Biol.* 149, 313-323. doi:10.1007/s00418-018-1640-6

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y.-H., Inada, M. et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764. doi:10.1016/S0092-8674(00)80258-5

Kondapaneni, Raghu Vamsi, Rachel Warren and Shreyas S. Rao. "Low dose chemotherapy induces a dormant state in brain metastatic breast cancer spheroids." *AIChE Journal* (2022): n. pag.

Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-smallcell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1556–1563.

Kreike, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative /basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 9, R65 (2007).

Krishna R, Mayer LD. Modulation of P-glycoprotein (PGP) mediated multidrug resistance (MDR) using chemosensitizers: recent advances in the design of selective MDR modulators. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2001;1:163-74. DOI PubMed

Kulkarni, M.; Tan, T.Z.; Sulaiman, N.B.S.; Lamar, J.M.; Bansal, P.; Cui, J.; Qiao, Y.; Ito, Y. RUNX1 and RUNX3 protect against YAP-mediated EMT, stem-ness and shorter survival outcomes in breast cancer. *Oncotarget* 2018, 9, 14175–14192.

Kumar and Ranjeeta Bansala. An overview of molecular mechanisms in cancer drug resistance and therapeutic strategies. *International Journal of Science and Research Archive*, 2024, 12(02), 1243–1258.

Lambert, A. W. & Weinberg, R. A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 21, 325–338 (2021).

Lau, Q.C.; Raja, E.; Salto-Tellez, M.; Liu, Q.; Ito, K.; Inoue, M.; Putti, T.C.; Loh, M.; Ko, T.K.; Huang, C.; et al. RUNX3 Is Frequently Inactivated by Dual Mechanisms of Protein Mislocalization and Promoter Hypermethylation in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2006, 66, 6512–6520.

Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011 May 24;104(11):1730-8. doi: 10.1038/bjc.2011.159.

Lee, Alice and Mustafa B. A. Djamgoz. "Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies." *Cancer treatment reviews* 62 (2018): 110-122

Lee, Y.M. RUNX Family in Hypoxic Microenvironment and Angiogenesis in Cancers. *Cells* 2022, 11, 3098. <https://doi.org/10.3390/cells11193098>

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011; 121: 2750–2767. doi: 10.1172/JCI45014DS1 PMID: 21633166

Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of Triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One* 2016;11:e0157368. DOI PubMed PMC

Lehmann, B.D. et al. (2014) PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res.* 16, 406

Leong, D.T.; Lim, J.; Goh, X.; Pratap, J.; Pereira, B.P.; Kwok, H.S.; Nathan, S.S.; Dobson, J.R.; Lian, J.B.; Ito, Y.; et al. Cancerrelated ectopic expression of the bone-related transcription factor RUNX2 in non-osseous metastatic tumor cells is linked to cell proliferation and motility. *Breast Cancer Res.* 2010, 12, R89.

Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L and Groner Y: AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: CDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 23: 425-432, 1994.

Li B, Zheng Y. Circulating tumor cell count: A reliable biomarker for treatment selection in metastatic breast cancer. *Thorac Cancer*. 2022 Jan;13(2):265-266. doi: 10.1111/1759-7714.14269. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34873852; PMCID: PMC8758428.

Li H, Ma F, Wang H, et al. Stem Cell Marker Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1)-Expressing Cells are Enriched in Triple-Negative Breast Cancer. *The International Journal of Biological Markers*. 2013;28(4):357-364. doi:10.5301/JBM.5000048

Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002;109:113–24.

Li S, Kennedy M, Payne S, Kennedy K, Seewaldt VL, Pizzo SV, Bachelder RE. Model of tumor dormancy/recurrence after short-term chemotherapy. *PLoS One*. 2014 May 20;9(5):e98021. doi: 10.1371/journal.pone.0098021. PMID: 24845582; PMCID: PMC4028269.

Li W, H. Zhang, Y.G. Assaraf, K. Zhao, X. Xu, J. Xie, D.-H. Yang, Z.-S. Chen, Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies, *Drug Resist. Updat.* 27 (2016) 14–29, <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2016.05.001>

Li Y, Xian M, Yang B, Ying M, He Q. Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin-Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells. *Stem Cell Reports.* 2017 Jun;6(6):1617-1629. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.025. Epub 2017 May 25. Erratum in: *Stem Cell Reports.* 2020 May 12;14(5):989-990. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.03.025. PMID: 28552603; PMCID: PMC5470096.

Li, Y., Zhang, H., Merkher, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* 15, 121 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0>

Li, Yangling, Xian, M., Yang, B., Ying, M., & He, Q. (2020). Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin-Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells. *Stem cell reports*, 14(5), 989–990. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.025>

Lian JB and Stein GS: Runx2/Cbfa1: A multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* 9: 2677-2685, 2003.

Liau, B.B., Sievers, C., Donohue, L.K., Gillespie, S.M., Flavahan, W.A., Miller, T.E., Venteicher, A.S., Hebert, C.H., Carey, C.D., Rodig, S.J., et al. (2017). Adaptive chromatin remodeling drives glioblastoma stem cell plasticity and drug tolerance. *Cell Stem Cell* 20, 233–246 e237.

Lie, A.L.M.; Mevel, R.; Patel, R.; Blyth, K.; Baena, E.; Kouskoff, V.; Lacaud, G. RUNX1 Dosage in Development and Cancer. *Mol. Cells* 2020, 43, 126–138.

Lie-A-Ling, M., Marinopoulou, E., Lilly, A. J., Challinor, M., Patel, R., Lancri, C., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2018). Regulation of RUNX1 dosage is crucial for efficient blood formation from hemogenic endothelium. *Development* 145, dev149419. doi:10.1242/dev.149419

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L (2008) Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26(8):1275–1281

Liedtke C., Christof Bernemann, Ludwig Kiesel, Achim Rody. Genomic Profiling in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast care* 2013; 8:408-413

Lilly, A. J., Costa, G., Largeot, A., Fadlullah, M. Z. H., Lie-A-Ling, M., Lacaud, G. and Kouskoff, V. (2016). Interplay between SOX7 and RUNX1 regulates hemogenic endothelial fate in the yolk sac. *Development* 143, 4341-4351. doi:10.1242/dev.140970

Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 15, 907–913. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>

Lin NU, et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer.* 2008;113(10):2638–45.

Lin TC. RUNX1 and cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022 May;1877(3):188715. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188715. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35271994.

Lin, Y.; Zhong, Y.; Guan, H.; Zhang, X.; Sun, Q. CD44+/CD24- phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012, 31, 59.

Lindstrom LS, Karlsson E, Wilking UM, et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol.* 2012; 30:2601–8. [PubMed: 22711854]

Lisencu, L.A.; Tranc ̄a, S.; Bonci, E.-A.; Pas, ca, A.; Mihu, C.; Irimie, A.; Tudoran, O.; Balacescu, O.; Lisencu, I.C. The Role of Circulating Tumor Cells in the Prognosis of Metastatic Triple-Negative Breast Cancers: A Systematic Review of the Literature. *Biomedicines* 2022, 10, 769. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040769>

Liu R, Shi P, Nie Z, Liang H, Zhou Z, Chen W, Chen H, Dong C, Yang R, Liu S, Chen C. Mifepristone Suppresses Basal Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells by Down-regulating KLF5 Expression. *Theranostics.* 2016 Feb 13;6(4):533-44. doi: 10.7150/thno.14315. PMID: 26941846; PMCID: PMC4775863.

Liu, S., Xing, Y., Lu, W., Li, S., Tian, Z., Xing, H., Tang, K., Xu, Y., Rao, Q., Wang, M., & Wang, J. (2019). RUNX1 inhibits proliferation and induces apoptosis of t(8;21) leukemia cells via KLF4-mediated transactivation of P57. *Haematologica*, 104(8), 1597–1607. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.192773>

Livasy, C. A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 19, 264–271 (2006).

Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23(1), 675–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154>

Loi, S. et al. Prognostic and predictive value of tumorinfiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02–98. *J. Clin. Oncol.* 31, 860–867 (2013).

Loibl S., F. André, T. Bachelot, C. H. Barrios, J. Bergh, H. J. Burstein, M. J. Cardoso, L. A. Carey, S. Dawood, L. Del Mastro, C. Denkert, E. M. Fallenberg, P. A. Francis, H. Gamal-Eldin, K. Gelmon, C. E. Geyer, M. Gnant, V. Guarneri, S. Gupta, S. B. Kim, D. Krug, M. Martin, I. Meattini, M. Morrow, W. Janni, S. Paluch-Shimon, A. Partridge, P. Poortmans, L. Pusztai, M. M. Regan, J. Sparano, T. Spanic, S. Swain, S. Tjulandin, M. Toi, D. Trapani, A. Tutt, B. Xu, G. Curigliano & N. Harbeck, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2024, Volume 35, Issue 2, 159 - 182

Longley, D.; Johnston, P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol. J. Pathol. Soc. Great Br. Irel.* 2005, 205, 275–292. esta no va

Lovly, C.M., and Shaw, A.T. (2014). Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clin. Cancer Res.* 20,2249–2256

Lu H, Xie Y, Tran L, Lan J, Yang Y, Murugan NL, Wang R, Wang YJ, Semenza GL. Chemotherapy-induced S100A10 recruits KDM6A to facilitate OCT4-mediated breast cancer stemness. *J Clin Invest.* 2020 Sep 1;130(9):4607-4623. doi: 10.1172/JCI138577. PMID: 32427586; PMCID: PMC7456215.

Luo, M., & Wicha, M. S. (2019). Targeting cancer stem cell redox metabolism to enhance therapy responses. *Seminars in Radiation Oncology*, 29(1), 42–54.

Lüönd, F. et al. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy. *Dev. Cell* 56, 3203–3221 (2021).

M. Kulkarni, T.Z. Tan, N.B. Syed Sulaiman, J.M. Lamar, P. Bansal, J. Cui, Y. Qiao, Y. Ito, RUNX1 and RUNX3 protect against YAP-mediated EMT, stem-ness and shorter survival outcomes in breast cancer, *Oncotarget* 9 (2018) 14175–14192.

Ma F, Li H, Li Y, Ding X, Wang H, Fan Y, Lin C, Qian H, Xu B. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(14):e6561. doi: 10.1097/MD.0000000000006561. PMID: 28383433; PMCID: PMC5411217.

Ma, F. et al. Enriched CD44(+)/CD24(-) population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Lett.* 353, 153–159 (2014).

Macfarlane R, Seal M, Speers C, Woods R, Masoudi H, Aparicio S, Chia SK. Molecular alterations between the primary breast cancer and the subsequent locoregional/metastatic tumor. *Oncologist*. 2012; 17:172–8. [PubMed: 22267852]

Madic, J. et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 136, 2158–2165 (2015).

Majidpoor, J. & Mortezaee, K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* 38, 3 (2021).

Makena MR, Ranjan A, Thirumala V, Reddy AP. Cancer stem cells: road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(4): 165339.

Mani, S. A. et al. The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715 (2008).

Manuel Iglesias J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, et al. (2013) Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-cadherin. *PLoS ONE* 8(10): e77281. doi:10.1371/journal.pone.0077281

Marine, J.-C., Dawson, S.-J. & Dawson, M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 20, 743–756 (2020).

Marks, S. C. and Odgren, P. R. (2002). Chapter 1 - structure and development of the skeleton. In *Principles of Bone Biology*, 2nd edn. (ed. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan), pp. 3-15. San Diego: Academic Press.

Marlow, R., Honeth, G., Lombardi, S., Cariati, M., Hessey, S., Pipili, A., ... Dontu, G. (2013). A novel model of dormancy for bone metastatic breast cancer cells. *Cancer Research* 73 (23), 6886–6899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-0991>

Marra A., Dario Trapani, Giulia Viale, Carmen Criscitiello and Giuseppe Curigliano. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *npj Breast Cancer* (2020) 6:54

Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, Dawson KJ, Haase K, Van Loo P, et al. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell* (2017) 171 (5):1029–41.e21. doi:10.1016/j.cell.2017.09.042

Marusyk, Andriy et al. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell*, Volume 37, Issue 4, 471 - 484

Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013;19:5533-40.

Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, et al. Identification of stem cells in the epithelium of the stomach corpus and antrum of mice. *Gastroenterology* . 2017;152:218–231. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.018

Matsuo J, Mon NN, Douchi D, et al. A RUNX1-enhancer element eR1 identified lineage restricted mammary luminal stem cells. *Stem Cells* . 2022;40:112–122. doi: 10.1093/stmcls/sxab009 .

Maxwell N, Skor, Erin L, Wonder, Masha Kocherginsky, Anju Goyal, Ben A. Hall, Yi Cai, and Suzanne D. Conzen. Glucocorticoid Receptor Antagonism as a Novel Therapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*; 19(22) November 15, 2013

McDonald, L.; Ferrari, N.; Terry, A.; Bell, M.; Mohammed, Z.M.; Orange, C.; Jenkins, A.; Muller, W.J.; Gusterson, B.A.; Neil, J.C.; et al. RUNX2 correlates with subtype-specific breast cancer in a human tissue microarray, and ectopic expression of Runx2 perturbs differentiation in the mouse mammary gland. *Dis. Model. Mech.* 2014, 7, 525–534.

McIntosh, K., Balch, C. and Tiwari, A.K. (2016) Tackling Multidrug Resistance Mediated by Efflux Transporters in Tumor-Initiating Cells. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12, 633-644. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1179280>

Mendoza-Villanueva, D.; Zeef, L.; Shore, P. Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBF $\beta$ -dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Res*. 2011, 13, R106.

Messeha, S. S. et al. The inhibitory effects of plumbagin on the NF- $\kappa$ B pathway and CCL2 release in racially different triple-negative breast cancer cells. *PLoS ONE* 13, e0201116 (2018).

Mevel R, Draper JE, Lie-A-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G. RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development*. 2019 Sep 5;146(17):dev148296. doi: 10.1242/dev.148296. PMID: 31488508.

Michael Lie-a-ling, Renaud Mevel, Rahima Patel, Karen Blyth, Esther Baena, Valerie Kouskoff, and Georges Lacaud. RUNX1 Dosage in Development and Cancer. *Mol. Cells* 2020; 43(2): 126-138

Miller AK, Brown JS, Enderling H, Basanta D and Whelan CJ (2021) The Evolutionary Ecology of Dormancy in Nature and in Cancer. *Front. Ecol. Evol.* 9:676802. doi: 10.3389/fevo.2021.676802

Min HY, Lee HY. Cellular dormancy in cancer: mechanisms and potential targeting strategies. *Cancer Res Treat*. 2023;55(3):720–36.

Mir Manzoor Ahmad, Hina Qayoom, Umar Mehraj, Safura Nisar, Basharat Ahmad Bhat and Nissar Ahmad Wani. “Targeting Different Pathways Using Novel Combination Therapy in Triple Negative Breast Cancer.” *Current cancer drug targets* (2020): n. pag.

Mittendorf, E.A., Zhang, H., Barrios, C.H., Saji, S., Jung, K.H., Hegg, R., Koehler, A., Sohn, J., Iwata, H., Telli, M.L., et al. (2020). Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 396, 1090–1100.

Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci.* 2012; 103: 913–920.

Mojica, C.A.R.; Ybanez, W.S.; Olarte, K.C.V.; Poblete, A.B.C.; Bagamasbad, P.D. Differential Glucocorticoid-Dependent Regulation and Function of the ERRFI1 Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *Endocrinology* 2020, 161, bcaa082.

Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 403–417.

Muhammad Tufail, Can-Hua Jiang and Ning Li. Tumor dormancy and relapse: understanding the molecular mechanisms of cancer recurrence. Tufail et al. *Military Medical Research* (2025) 12:7

Murray Brunt A, Haviland JS, Wheatley DA, et al. Hypofractionated breast radiotherapy for 1 week versus 3 weeks (FAST-Forward): 5-year efficacy and late normal tissue effects results from a multicentre, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2020; 395 (10237):1613-1626

Murray D, Mirzayans R. Cellular Responses to Platinum-Based Anticancer Drugs and UVC: Role of p53 and Implications for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 11;21(16):5766. doi: 10.3390/ijms21165766. PMID: 32796711; PMCID: PMC7461110.

Muscella, A., Vetrugno, C., Cossa, L. G. & Marsigliante, S. TGF- $\beta$ 1 activates RSC96 Schwann cells migration and invasion through MMP-2 and MMP-9 activities. *J. Neurochem.* 153, 525–538 (2020).

Nagata, T., Gupta, V., Sorce, D., Kim, W.-Y., Sali, A., Chait, B. T., Shigesada, K., Ito, Y. and Werner, M. H. (1999). Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF Runt domain. *Nat. Struct. Biol.* 6, 615-619.

Nairuz T, Mahmud Z, Manik RK, Kabir Y. Cancer stem cells: an insight into the development of metastatic tumors and therapy resistance. *Stem Cell Rev Rep.* 2023 Aug;19(6):1577-1595.

Nakahata K, Uehara S, Nishikawa S, Kawatsu M, Zenitani M, Oue T, Okuyama H. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Is a Potential Marker for Cancer Stem Cells in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *PLoS One.* 2015 Apr 27;10(4):e0125454.

Nana Ji, Jianhui Yuan, Jianjun Liu, and Shengli Tian. Developing multidrug-resistant cells and exploring correlation between BCRP/ABCG2 over-expression and DNA methyltransferase. *Acta Biochim Biophys Sin* (2010) | Volume 42 | Issue 12 | Page 862

Narod SA, Dent RA, Foulkes WD. CCR 20th Anniversary Commentary: Triple-Negative Breast Cancer in 2015—Still in the Ballpark. *Clin Cancer Res.* 2015 Sep 1;21(17):3813-4. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3122. PMID: 26330504.

Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:47–76.

Naumov, G. N., Akslen, L. A., & Folkman, J. (2006). Role of angiogenesis in human tumor dormancy: Animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5(16), 1779–1787. <https://doi.org/10.4161/cc.5.16.3018>.

Nieto, M. A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342, 1234850–1234850. doi: 10.1126/science.1234850

Nik-Zainal, S.; Davies, H.; Staaf, J.; Ramakrishna, M.; Glodzik, D.; Zou, X.; Martincorena, I.; Alexandrov, L.B.; Martin, S.; Wedge, D.C.; et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016, 534, 47–54.

Nolan et al., Deciphering breast cancer: from biology to the clinic, *Cell* (2023), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040>

Nooter, K.; Brutel De La Riviere, G.; Look, M.; Van Wingerden, K.; Henzen-Logmans, S.; Scheper, R.; Flens, M.; Klijn, J.; Stoter, G.; Foekens, J. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 1997, 76, 486–493.

Noureddine, L.M., Trédan, O., Hussein, N., Badran, B., le Romancer, M., and Poulard, C. (2021). Glucocorticoid receptor: A multifaceted actor in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 22.

Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M. & Denisov, E. V. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 124, 102–114 (2021).

Nur Syamimi Ariffin. RUNX1 as a Novel Molecular Target for Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2022, Vol. 22, No. 6, 499–506

Obenauf, A. C. & Massague, J. Surviving at a distance: organ-specific metastasis. *Trends Cancer* 1, 76–91 (2015).

Obradović MMS, Hamelin B, Manevski N, Couto JP, Sethi A, Coissieux MM, Münst S, Okamoto R, Kohler H, Schmidt A, Bentires-Alj M. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2019 Mar;567(7749):540-544. doi: 10.1038/s41586-019-1019-4. Epub 2019 Mar 13.

Offersen BV, Boersma LJ, Kirkove C, et al. ESTRO consensus guideline on target volume delineation for elective radiation therapy of early stage breast cancer, version 1.1. *Radiother Oncol*. 2016;118(1):205-208.

Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G & Downing JR (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84,321–330.

Onodera, Y.; Miki, Y.; Suzuki, T.; Takagi, K.; Akahira, J.-I.; Sakyu, T.; Watanabe, M.; Inoue, S.; Ishida, T.; Ohuchi, N.; et al. Runx2 in human breast carcinoma: Its potential roles in cancer progression. *Cancer Sci*. 2010, 101, 2670–2675.

Oren, Y. et al. Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* 596, 576–582 (2021).

Orlando UD, Castillo AF, Medrano MAR, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Acyl-CoA synthetase-4 is implicated in drug resistance in breast cancer cell lines involving the regulation of energy-dependent transporter

expression. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jan;159:52-63. doi: 10.1016/j.bcp.2018.11.005. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30414939.

Osmani, N., Follain, G., León, M. J. G., Lefebvre, O., Busnelli, I., Larnicol, A., ... Goetz, J. G. (2019). Metastatic tumor cells exploit their adhesion repertoire to counteract shear forces during intravascular arrest. *Cell Reports* 28(10), 2491–2500.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.102>

Othman A, Winogradzki M, Patel S, Holmes W, Blank A and Pratap J: The role of Runx2 in microtubule acetylation in bone metastatic breast cancer cells. *Cancers (Basel)* 14: 3436, 2022.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765-71; PMID:9182764; DOI:10.1016/S0092-8674(00)80259-7.

Owens, T. W., Rogers, R. L., Best, S. A., Ledger, A., Mooney, A.-M., Ferguson, A., Shore, P., Swarbrick, A., Ormandy, C. J., Simpson, P. T. et al. (2014). Runx2 is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer. *Cancer Res*. 74, 5277-5286. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0053

Oxnard, G. R. et al. Association Between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 34, 3375–3382 (2016).

Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem* 2012;19:1946-2025. DOI PubMed

Pan, D., Kocherginsky, M. & Conzen, S. D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 71, 6360–6370 (2011).

Pande, S.; Browne, G.; Padmanabhan, S.; Zaidi, S.K.; Lian, J.B.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S. Oncogenic cooperation between PI3K/Akt signaling and transcription factor Runx2 promotes the invasive properties of metastatic breast cancer cells. *J. Cell Physiol*. 2013, 228, 1784–1792.

Panigoro SS, Kurnia D, Kurnia A, Haryono SJ, Albar ZA. ALDH1 Cancer Stem Cell Marker as a Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Surg Oncol*. 2020 Jul 3;2020:7863243. doi: 10.1155/2020/7863243. PMID: 32695508; PMCID: PMC7354666.

Park SY, Nam JS. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Exp Mol Med*. 2020 Apr;52(4):569-581. doi: 10.1038/s12276-020-0423-z. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32300189; PMCID: PMC7210927.

Park, S.Y., Lee, H.E., Li, H., et al. (2010) Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16, 876-887.

Pastushenko, I. et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468 (2018)

Peeters, D.J.E.; van Dam, P.J.; van den Eynden, G.G.M.; Rutten, A.; Wuyts, H.; Pouillon, L.; Peeters, M.; Pauwels, P.; van Laere, S.J.; van Dam, P.A.; et al. Detection and prognostic significance of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer according to immunohistochemical subtypes. *Br. J. Cancer* 2014, 110, 375–383.

Pegg, H.J., Harrison, H., Rogerson, C., and Shore, P. (2019). The RUNX transcriptional coregulator, CBFbeta, suppresses migration of ER(+) breast cancer cells by repressing ERalpha-mediated expression of the migratory factor TFF1. *Mol. Cancer Res.* 17, 1015-1023.

Pérez González A, Kevin Bévant & Cédric Blanpain. Cancer cell plasticity during tumor progression, metastasis and response to therapy. *Nature cancer*, 2023, 1063–1082.

Pérez-De Marcos Juan-Carlos, Pérez-Pineda Perla-Lidia, Méndez-Morales Stephanie-Talia, Arellano-Mendoza Mónica-Griselda, Torres-Espíndola Luz-María. ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Molecular Biology Reports* (2021) 48:1883–1901 <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06155-w>

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.* 2018;2018:5416923.

Pisco, A. O. et al. Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nat. Commun.* 4, 2467 (2013).

Ponomarev, A.S., Gilazieva, Z.E., Solovyova, V.V. et al. Molecular Mechanisms of Tumor Cell Stemness Modulation during Formation of Spheroids. *Biochemistry Moscow* 88, 979–994 (2023). <https://doi.org/10.1134/S0006297923070106>

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5506-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626. PMID: 15994920.

Pontier, S. M. & Muller, W. J. Integrins in mammary stem-cell biology and breast-cancer progression — a role in cancer stem cells? *J. Cell Sci.* 122, 207–214 (2009).

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011 Feb;5(1):5-23. doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21147047; PMCID: PMC5528267.

Pratap, J.; Javed, A.; Languino, L.R.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Lian, J.B. The Runx2 Osteogenic Transcription Factor Regulates Matrix Metalloproteinase 9 in Bone Metastatic Cancer Cells and Controls Cell Invasion. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25, 8581–8591.

Pratap, J.; Lian, J.B.; Javed, A.; Barnes, G.L.; Van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S. Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 589–600.

Pratap, J.; Lian, J.B.; Stein, G.S. Metastatic bone disease: Role of transcription factors and future targets. *Bone* 2011, 48, 30–36.

Pratap, J.; Wixted, J.J.; Gaur, T.; Zaidi, S.K.; Dobson, J.; Gokul, K.D.; Hussain, S.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; et al. Runx2 Transcriptional Activation of Indian Hedgehog and a Downstream Bone Metastatic Pathway in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2008, **68**, 7795–7802.

Prekovic S, Schuurman K, Mayayo-Peralta I, Manjón AG, Buijs M, Yavuz S, Wellenstein MD, Barrera A, Monkhorst K, Huber A, Morris B, Liefert C, Chalkiadakis T, Alkan F, Silva J, Győrffy B, Hoekman L, van den Broek B, Teunissen H, Debets DO, Severson T, Jonkers J, Reddy T, de Visser KE, Faller W, Beijersbergen R, Altelaar M, de Wit E, Medema R, Zwart W. Glucocorticoid receptor triggers a reversible drug-tolerant dormancy state with acquired therapeutic vulnerabilities in lung cancer. *Nat Commun.* 2021 Jul 16;12(1):4360.

Puisieux A, Pommier RM, Morel AP, Lavial F. Cellular pliancy and the multistep process of tumorigenesis. *Cancer Cell* (2018) **33**(2):164–72. doi: 10.1016/j.ccr.2018.01.007

Q. Li, Q. Lai, C. He, H. Zhang, X. Pan, H. Li, Q. Yan, Y. Fang, S. Liu, A. Li, RUNX1 regulates the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer through the hedgehog signaling pathway, *J. Cancer* 12 (2021) 6363–6371.

Qing, G., & Simon, M. C. (2009). Hypoxia inducible factor-2 $\alpha$ : A critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Current Opinion in Genetics & Development* 19(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.12.001>

Qingyuan Li, Qiuhsia Lai, Chengcheng He, Haonan Zhang, Xingzhu Pan, Haolin Li, Qun Yan, Yuxin Fang, Side Liu, Aimin Li. RUNX1 regulates the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer through the Hedgehog signaling pathway. *Journal of Cancer*, 2021; **12**(21): 6363-6371. doi: 10.7150/jca.51338

Radovich, M. et al. Association of circulating tumor DNA and circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy with disease recurrence in patients with triple-negative breast cancer: preplanned secondary analysis of the BRE12-158 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 6, 1410–1415 (2020).

Ramasamy, T. S., et al. (2015). Targeting colorectal cancer stem cells using curcumin and curcumin analogues: Insights into the mechanism of the therapeutic efficacy. *Cancer Cell International*, 15, 96.

Ran, R., Harrison, H., Syamimi Ariffin, N., Ayub, R., Pegg, H. J., Deng, W., Mastro, A., Ottewell, P. D., Mason, S. M., Blyth, K., Holen, I., & Shore, P. (2020). A role for CBF $\beta$  in maintaining the metastatic phenotype of breast cancer cells. *Oncogene*, 39(12), 2624–2637. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1170-2>

Recouvreux, M. S., Grasso, E. N., Echeverria, P. C., Rocha-Viegas, L., Castilla, L.H., Schere-Levy, C., ... Rubinstein, N. (2016). RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes. *Oncotarget*, 7(6), 6552–6565.

Reuben, J. M., Lee, B. N., Gao, H., Cohen, E. N., Mego, M., Giordano, A., et al. (2011). Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44 + CD24 low cancer stem cell phenotype. *Eur. J. Cancer* 47, 1527–1536. doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.011

Ricardo, S.; Vieira, A.F.; Gerhard, R.; Leitao, D.; Pinto, R.; Cameselle-Teijeiro, J.F.; Milanezi, F.; Schmitt, F.; Paredes, J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* 2011, **64**, 937–946.

Riggio AI, Blyth K. The enigmatic role of RUNX1 in female-related cancers - current knowledge & future perspectives. *FEBS J.* 2017 Aug;284(15):2345-2362. doi: 10.1111/febs.14059. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28304148.

Risom, T., Langer, E.M., Chapman, M.P., Rantala, J., Fields, A.J., Boniface, C., Alvarez, M.J., Kendersky, N.D., Pelz, C.R., Johnson-Camacho, K., et al. (2018). Differentiation-state plasticity is a targetable resistance mechanism in basal-like breast cancer. *Nat. Commun.* 9, 3815

Roarty K and Echeverria GV (2021). Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis. *Front. Oncol.* 11:645698. doi: 10.3389/fonc.2021.645698

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 2018;18:452-64. DOI PubMed PMC

Rodriguez MS, Mahmoud YD, Vanzulli S, Giulianelli S, Spengler E, Martínez Vazquez P, Burruchaga J, Bushweller J, Lamb CA, Lüthy IA, Lanari C, Pérez Piñero C. FGFR2-RUNX2 activation: An unexplored therapeutic pathway in luminal breast cancer related to tumor progression. *Int J Cancer*. 2024 Dec 28. doi: 10.1002/ijc.35302. Epub ahead of print. PMID: 39731522.

Rooney, N., Riggio, A.I., Mendoza-Villanueva, D., Shore, P., Cameron, E.R., Blyth, K. (2017). Runx Genes in Breast Cancer and the Mammary Lineage. In: Groner, Y., Ito, Y., Liu, P., Neil, J., Speck, N., van Wijnen, A. (eds) RUNX Proteins in Development and Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 962. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2_22)

Roy A, Chauhan S, Bhattacharya S, Jakhmola V, Tyagi K, Sachdeva A, Wasai A, Mandal S. Runt-related transcription factors in human carcinogenesis: a friend or foe? *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023 Sep;149(11):9409-9423. doi: 10.1007/s00432-023-04769-0. Epub 2023 Apr 21. PMID: 37081242.

Rushton AJ, Ntelopoulos G, Shaw JA, Coombes RC. A Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 26;13(5):970. doi: 10.3390/cancers13050970..

Rutkovskiy, A.; Stensløkken, K.-O.; Vaage, I.J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 2016, 22, 95–106.

Salinas-Vera YM, Valdes J, Perez Navarro Y, Mandujano-Lazaro G, Marchat LA, Ramos-Payan R, Nuñez-Olvera SI, Pérez-Plascencia C and López-Camarillo C (2022). Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front. Oncol.* 12:826113. doi: 10.3389/fonc.2022.826113

Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimar dani M, Pasdar A et al (2019) PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 234(10):16824–16837

San Lucas, F. A. et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next generation sequencing of circulating exosomes. *Ann. Oncol.* 27, 635–641 (2016).

Sarhangi N, Shahrzad Hajjari, Seyede Fatemeh Heydari, Maryam Ganjizadeh, Fatemeh Rouhollah, Mandana Hasanzad. Breast cancer in the era of precision medicine. *Molecular Biology Reports* (2022) 49:10023–10037. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07571-2>

Saura C, Tseng L-M, Chan S, Chacko RT, Campone M, Manikhas A, et al. Neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or paclitaxel in early stage breast cancer and evaluation of  $\beta$ III-tubulin expression as a predictive marker. *Oncologist*. 2013; 18: 787–794. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0075

Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.* 2011 Jul 7;2(7):e179. doi: 10.1038/cddis.2011.61.

Schmid, P., Adams, S., Rugo, H.S., Schneeweiss, A., Barrios, C.H., Iwata, H., Die'ras, V., Hegg, R., Im, S.A., Shaw Wright, G., et al. (2018). Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 379, 2108–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>.

Schmid, P., Cortes, J., Dent, R., Pusztai, L., McArthur, H., Ku' mmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y.H., Hui, R., et al. (2022). Event-free survival with pembrolizumab in early triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 386, 556–567.

Seo, W., Tanaka, H., Miyamoto, C., Levanon, D., Groner, Y. and Taniuchi, I. (2012b). Roles of VWRPY motif-mediated gene repression by Runx proteins during T-cell development. *Immunol. Cell Biol.* 90, 827-830. doi:10.1038/icb.2012.6

Shaffer, S. M. et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435 (2017).

Shah, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers. *Nature* 486, 395–399 (2012).

Shang, M. et al. Potential management of circulating tumor DNA as a biomarker in triple-negative breast cancer. *J. Cancer* 9, 4627–4634 (2018).

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A. & Ribas, A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168, 707–723 (2017).

Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69–80

She C, Wu C, Guo W, Xie Y, Li S, Liu W, Xu C, Li H, Cao P, Yang Y, Wang X, Chang A, Feng Y, Hao J. Combination of RUNX1 inhibitor and gemcitabine mitigates chemo-resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by modulating BiP/PERK/eIF2 $\alpha$ -axis-mediated endoplasmic reticulum stress. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023 Sep 11;42(1):238. doi: 10.1186/s13046-023-02814-x. PMID: 37697370; PMCID: PMC10494371.

Shen, S., Vagner, S. & Robert, C. Persistent cancer cells: the deadly survivors. *Cell* 183, 860–874 (2020).

Sherwood, L. M., Parris, E. E., & Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/nejm197111182852108>.

Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann. Oncol.* 26, 1291–1299 (2015).

Shu, S., Lin, C.Y., He, H.H., Witwicki, R.M., Tabassum, D.P., Roberts, J.M., Janiszewska, M., Huh, S.J., Liang, Y., Ryan, J., et al. (2016). Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature* 529, 413–417

Si W, Xu X, Wan L, Lv F, Wei W, Xu X, Li W, Huang D, Zhang L and Li F (2022) RUNX2 facilitates aggressiveness and chemoresistance of triple negative breast cancer cells via activating MMP1. *Front. Oncol.* 12:996080. doi: 10.3389/fonc.2022.996080

Si W, Xu X, Wan L, Lv F, Wei W, Xu X, Li W, Huang D, Zhang L and Li F: RUNX2 facilitates aggressiveness and chemoresistance of triple negative breast cancer cells via activating MMP1. *Front Oncol* 12: 996080, 2022.

Silva Paiva, R., Gomes, I., Casimiro, S., Fernandes, I. & Costa, L. c-Met expression in renal cell carcinoma with bone metastases. *J. Bone Oncol.* 25, 100315 (2020).

Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29(34), 4741–4751. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>

Snyder, V., et al. (2018). Cancer stem cell metabolism and potential therapeutic targets. *Frontiers in Oncology*, 8, 203.

Sood, R.; Kamikubo, Y.; Liu, P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* 2017, 129, 2070–2082.

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

Sørlie, T., Robert Tibshirani, Joel Parker, Trevor Hastie, J. S. Marron, Andrew Nobel, Shbing Deng, Hilde Johnsen, Robert Pesich, Stephanie Geisler, Janos Demeter, Charles M. Perou, Per E. Lønning, Patrick O. Brown, Anne-Lise Børresen-Dale, and David Botstein. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. (2003). *PNAS* vol. 100 no. 14 8418–8423

Sorrentino, G., Ruggeri, N., Zannini, A. et al. Glucocorticoid receptor signalling activates YAP in breast cancer. *Nat Commun* 8, 14073 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms14073>

Sosa, M., Parikh, F., Maia, A. et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR $\beta$ -driven quiescence programmes. *Nat Commun* 6, 6170 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7170>

So-Yeon Park and Jeong-Seok Nam. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine* (2020) 52:569–581 <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0423-z>

Spiliotaki, M., Mavroudis, D., Kapranou, K., Markomanolaki, H., Kallergi, G., Koinis, F., Kalbakis, K., Georgoulias, V., & Agelaki, S. (2014). Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Research* 16(6), 485. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0485-8>.

Spranger, S. et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 200ra116 (2013).

Sroczynska, P., Lancrin, C., Kouskoff, V. and Lacaud, G. (2009). The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood* 114, 5279-5289. doi:10.1182/blood-2009-05-222307

Steelman, L. S. et al. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. *Oncogene* 27, 4086–4095 (2008).

Stover, D. G. et al. Association of cell-free DNA tumor fraction and somatic copy number alterations with survival in metastatic triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 36, 543–553 (2018).

Strasser-Weippl K, Goss PE. Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women. *J Clin Oncol* (2005) 23:1751–9. doi: 10.1200/JCO.2005.11.038

Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458 (7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>.

Sundaresan, T. K. et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses. *Clin. Cancer Res.* 22, 1103–1110 (2016).

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

T. Aasen, M. Mesnil, C.C. Naus, P.D. Lampe, D.W. Laird, Gap junctions and cancer: communicating for 50 years, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016) 775–788.

Tahirov, T.H.; Inoue-Bungo, T.; Morii, H.; Fujikawa, A.; Sasaki, M.; Kimura, K.; Shiina, M.; Sato, K.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; et al. Structural Analyses of DNA Recognition by the AML1/Runx-1 Runt Domain and Its Allosteric Control by CBF $\beta$ . *Cell* 2001, 104, 755–767.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.

Takeshita, T. et al. Prognostic role of PIK3CA mutations of cell-free DNA in earlystage triple negative breast cancer. *Cancer Sci.* 106, 1582–1589 (2015).

Tanei, T.; Morimoto, K.; Shimazu, K.; Kim, S.J.; Tanji, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Noguchi, S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 4234–4241.

Tegze B, Szallasi Z, Haltrich I, Penzvalto Z, Toth Z, et al. (2012) Parallel Evolution under Chemotherapy Pressure in 29 Breast Cancer Cell Lines Results in Dissimilar Mechanisms of Resistance. *PLoS ONE* 7(2): e30804. doi:10.1371/journal.pone.0030804

Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulk J, et al. (2014) Correlations of Differentially Expressed Gap Junction Connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with Breast Cancer Progression and Prognosis. *PLOS ONE* 9(11): e112541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112541>

Telfer, J. C., Hedblom, E. E., Anderson, M. K., Laurent, M. N. and Rothenberg, E. V. (2004). Localization of the domains in Runx transcription factors required for the repression of CD4 in thymocytes. *J. Immunol.* 172, 4359-4370. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4359

Terry A, Kilbey A, Vaillant F, Stewart M, Jenkins A, Cameron E and Neil JC: Conservation and expression of an alternative 3' exon of Runx2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain. *Gene* 336: 115-125, 2004.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70 (2012).

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4-27 (2016).

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139(5), 871-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.

Thomas H., H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein, *Cancer Control* 10 (2003). 159-165, <https://doi.org/10.1177/107327480301000207>.

Thomas W. Owens, Renee L. Rogers, Sarah A. Best<sup>3,4</sup>, Anita Ledger, Anne-Marie Mooney, Alison Ferguson, Paul Shore, Alexander Swarbrick, Christopher J. Ormandy, Peter T. Simpson, Jason S. Carroll, Jane E. Visvader<sup>3,4</sup>, and Matthew J. Naylor. Runx2 Is a Novel Regulator of Mammary Epithelial Cell Fate in Development and Breast Cancer. *Cancer Res* 2014;74:5277-5286

Thomas, H.; Coley, H.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting pglycoprotein. *Cancer Control* 2003, 10, 159-165.

Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, Nielsen TO, Foulkes WD (2007) Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7:134

Tocci, J. M., Felcher, C. M., García Solá, M. E., Goddio, M. V., Zimberlin, M. N., Rubinstein, N., ... & Kordon, E. C. (2018). R-spondin3 is associated with basal-progenitor behavior in normal and tumor mammary cells. *Cancer research*, 78(16), 4497-4511.

Todaro, M., et al. (2010). Colon cancer stem cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology*, 138(6), 2151-2162.

Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends — an update. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 25, 16-27 (2016).

Trepat, X., Chen, Z. & Jacobson, K. Cell migration. *Compr. Physiol.* 2, 2369-2392 (2012).

Triller, N.; Korošec, P.; Kern, I.; Košnik, M.; Debeljak, A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: Expression of Pglycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 2006, 54, 235-240.

Truskowski K, Amend SR, Pienta KJ. Dormant cancer cells: Programmed quiescence, senescence, or both? *Cancer Metastasis Rev.* 2023;42(1):37-47.

Tufail M, Hu JJ, Liang J, He CY, Wan WD, Huang YQ, Jiang CH, Wu H, Li N. Hallmarks of cancer resistance. *iScience*. 2024 May 15;27(6):109979. doi: 10.1016/j.isci.2024.109979. PMID: 38832007; PMCID: PMC11145355.

Tumeh, P.C.; Harview, C.L.; Yearley, J.H.; Shintaku, I.P.; Taylor, E.J.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014, 515, 568–571.

Turner, N. C. et al. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J.* 27, 1368–1377 (2008).

Tutt, A.N.J., Garber, J.E., Kaufman, B., Viale, G., Fumagalli, D., Rastogi, P., Gelber, R.D., de Azambuja, E., Fielding, A., Balmanc̄a, J., et al. (2021). Adjuvant olaparib for patients with BRCA1- or BRCA2-mutated breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 384, 2394–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2105215>.

Ueng, S. H. et al. Phosphorylated mTOR expression correlates with poor outcome in early-stage triple negative breast carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5, 806–813 (2012).

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* (2011) 147(2):275–92. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024

Van Bragt, M. P., Hu, X., Xie, Y., & Li, Z. (2014). RUNX1, a transcription factor mutated in breast cancer, controls the fate of ER-positive mammary luminal cells. *eLife*, 3, e03881

Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D.M. A view on drug resistance in cancer. *Nature* 575, 299–309 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>

Vaupel, P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 13(Suppl 3), 21–26 (2008).

Vishnoi M, Peddibhotla S, Yin W, T Scamardo A, George GC, Hong DS, Marchetti D. The isolation and characterization of CTC subsets related to breast cancer dormancy. *Sci Rep.* 2015 Dec 3;5:17533. doi: 10.1038/srep17533. PMID: 26631983; PMCID: PMC4668355.

Volden, P.A.; Conzen, S.D. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain Behav. Immun.* 2013, 30, S26–S31.

Waghray, D., & Zhang, Q. (2018). Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *Journal of medicinal chemistry*, 61(12), 5108–5121. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01457>

Wan, G. et al. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3β/β-catenin pathway. *Cell Signal* 59, 1–12 (2019).

Wan, J. C. M. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* 17, 223–238 (2017).

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtukova I, Zhang L, Mayr C et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008; 456: 470–476.

Wang J-Q, Wu Z-X, Yang Y, et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent updates. *J Evid Based Med.* 2021;1-25. <https://doi.org/10.1111/jebm.12434>

Wang L, Brugge JS, Janes KA. Intersection of FOXO- and RUNX1-mediated gene expression programs in single breast epithelial cells during morphogenesis and tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: E803–E812.

Wang X, Zhao Y, Qian H, Huang J, Cui F, Mao Z. The miR101/RUNX1 feedback regulatory loop modulates chemosensitivity and invasion in human lung cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):15030–42.

Wang XX, Ye FG, Zhang J, Li JJ, Chen QX, Lin PY and Song CG: Serum miR-4530 sensitizes breast cancer to neoadjuvant chemotherapy by suppressing RUNX2. *Cancer Manag Res* 10: 4393-4400, 2018.

Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 2014;512:155–60.

Wang YH, Shen CY, Lin SC, Kuo WH, Kuo YT, Hsu YL, Wang WC, Lin KT, Wang LH. Monocytes secrete CXCL7 to promote breast cancer progression. *Cell Death Dis.* 2021 Nov 17;12(12):1090. doi: 10.1038/s41419-021-04231-4. PMID: 34789744; PMCID: PMC8599470.

Wang, C. et al. Longitudinally collected CTCs and CTC-clusters and clinical outcomes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 161, 83–94 (2017).

Wang, F.; Li, D.; Zheng, Z.; Kin Wah To, K.; Chen, Z.; Zhong, M.; Su, X.; Chen, L.; Fu, L. Reversal of ABCB1-related multidrug resistance by ERK5-IN-1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020, 39, 50.

Wang, H.; Wang, Y.; Rayburn, E.R.; Hill, D.L.; Rinehart, J.J.; Zhang, R. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: Potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. *Int. J. Oncol.* 2007, 30, 947–953. [CrossRef] [PubMed]

Wang, Le, Chengrong Mi and Wen Wang. “[Establishment of lymph node metastasis of MDA-MB-231 breast cancer model in nude mice].” *Zhonghua yi xue za zhi* 95 23 (2015): 1862-5 .

Wang, S. W. and Speck, N. A. (1992). Purification of core-binding factor, a protein that binds the conserved core site in murine leukemia virus enhancers. *Mol. Cell. Biol.* 12, 89-102. doi:10.1128/MCB.12.1.89

Wang, Y. H., & Scadden, D. T. (2015). Harnessing the apoptotic programs in cancer stem-like cells. *EMBO Reports*, 16(9), 1084–1098.

Wei Y, Li Y, Chen Y, Liu P, Huang S, Zhang Y, Sun Y, Wu Z, Hu M, Wu Q, Wu H, Liu F, She T, Ning Z. ALDH1: A potential therapeutic target for cancer stem cells in solid tumors. *Front Oncol.* 2022 Oct 28;12:1026278. doi: 10.3389/fonc.2022.1026278. PMID: 36387165; PMCID: PMC9650078.

Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine* 17(11), 1359. <https://doi.org/10.1038/nm.2537>

West, D. C. et al. GR and ER Coactivation alters the expression of Differentiation Genes and Associates with improved ER + breast Cancer outcome. *Mol. Cancer Res.* 14, 707–719 (2016).

West, N. R. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 13, R126 (2011).

Wimberly, H. et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* 3, 326–332 (2015).

Wu SZ, Al-Eryani G, Roden DL, Junankar S, Harvey K, Andersson A, Thennavan A, Wang C, Torpy JR, Bartonicek N, Wang T, Larsson L, Kaczorowski D, Weisenfeld NI, Uytingco CR, Chew JG, Bent ZW, Chan CL, Gnanasambandapillai V, Dutertre CA, Gluch L, Hui MN, Beith J, Parker A, Robbins E, Segara D, Cooper C, Mak C, Chan B, Warrier S, Ginhoux F, Millar E, Powell JE, Williams SR, Liu XS, O'Toole S, Lim E, Lundeberg J, Perou CM, Swarbrick A. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nat Genet.* 2021 Sep;53(9):1334-1347.

Wu, J., Wang, Q., Dong, X., Xu, M., Yang, J., Yi, X., Chen, B., Dong, X., Wang, Y., Lou, X., Xia, F., Wang, S., & Dai, J. (2021). Biocompatible AIEgen/p-glycoprotein siRNA@reduction-sensitive paclitaxel polymeric prodrug nanoparticles for overcoming chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Theranostics*, 11(8), 3710–3724. <https://doi.org/10.7150/thno.53828>

Xiao L, Peng Z, Zhu A, Xue R, Lu R, Mi J, Xi S, Chen W, Jiang S. Inhibition of RUNX1 promotes cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2020;180: 114116.

Xiao, J.; Pohlmann, P.R.; Isaacs, C.; Weinberg, B.A.; He, A.R.; Schlegel, R.; Agarwal, S. Circulating Tumor Cells: Technologies and Their Clinical Potential in Cancer Metastasis. *Biomedicines* 2021, 9, 1111. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091111>

Xingwang Hu, Laura Ghisolfi, Andrew C. Keates, Jian Zhang, Shuanglin Xiang, Dong-ki Lee & Chiang J. Li (2012) Induction of cancer cell stemness by chemotherapy, *Cell Cycle*, 11:14, 2691-2698, DOI: 10.4161/cc.21021

Xinyi Chen, Lu Wang, Mu Yang, Weiheng Zhao, Jingyao Tu, Bo Liu, Xianglin Yuan. RUNX transcription factors: biological functions and implications in cancer. *Clinical and Experimental Medicine* (2024) 24:50 <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01281-0>

Xiong, X., Zheng, LW., Ding, Y. et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. *Sig Transduct Target Ther* 10, 49 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02108-4>

Xu H, Zhang F, Gao X, Zhou Q, Zhu L. Fate decisions of breast cancer stem cells in cancer progression. *Front Oncol.* 2022 Aug 15;12:968306. doi: 10.3389/fonc.2022.968306. PMID: 36046046; PMCID: PMC9420991.

Xu J, Song J, Xiao M, Wang C, Zhang Q, Yuan X, Tian S. RUNX1 (RUNX family transcription factor 1), a target of microRNA miR-128-3p, promotes temozolomide resistance in glioblastoma multiform by upregulating multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1). *Bioengineered.* 2021;12(2):11768–81.

Xu, F., et al. (2014). Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 14(1), 142.

Xu, X., et al. (2015). Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Letters*, 369(1), 50–57

Yadav, A., Kumar, B., Yu, J. -G., Old, M., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2015). Tumor-associated endothelial cells promote tumor metastasis by chaperoning circulating tumor cells and protecting them from Anoikis. *PLoS One* 10(10), Article e0141602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141602>

Yamada, A. et al. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res. Treat.* 137, 773–782 (2013).

Yamagata T, Maki K and Mitani K: Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol* 82: 1-8, 2005.

Yan, J.; Liu, Y.; Lukasik, S.M.; A Speck, N.; Bushweller, J.H. CBF $\beta$  allosterically regulates the Runx1 Runt domain via a dynamic conformational equilibrium. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, 11, 901–906.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabietz, T., Bronner, M., ... (TEMTIA), O. behalf of the E. I. A (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>

Yang, L., Shi, P., Zhao, G. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* 5, 8 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>

Yates, L. R. et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat. Med.* 21, 751–759 (2015).

Yi H, He Y, Zhu Q, Fang L. RUNX Proteins as Epigenetic Modulators in Cancer. *Cells*. 2022 Nov 20;11(22):3687. doi: 10.3390/cells11223687. PMID: 36429115; PMCID: PMC9688118.

Yi, H.; He, Y.; Zhu, Q.; Fang, L. RUNX Proteins as Epigenetic Modulators in Cancer. *Cells* 2022, 11, 3687. <https://doi.org/10.3390/cells11223687>

Yin X, Teng X, Ma T, Yang T, Zhang J, Huo M, Liu W, Yang Y, Yuan B, Yu H, Huang W, Wang Y. RUNX2 recruits the NuRD(MTA1)/CRL4B complex to promote breast cancer progression and bone metastasis. *Cell Death Differ.* 2022 Nov;29(11):2203-2217. doi: 10.1038/s41418-022-01010-2. Epub 2022 May 9. PMID: 35534547; PMCID: PMC9613664.

Yin X, Teng X, Ma T, Yang T, Zhang J, Huo M, Liu W, Yang Y, Yuan B, Yu H, Huang W, Wang Y. RUNX2 recruits the NuRD(MTA1)/CRL4B complex to promote breast cancer progression and bone metastasis. *Cell Death Differ.* 2022 Nov;29(11):2203-2217. doi: 10.1038/s41418-022-01010-2. Epub 2022 May 9. PMID: 35534547; PMCID: PMC9613664.

Yoshida K, Miki Y (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95(11):866–871

Young AS, Mullins CE, Sehgal N, Vermeulen RCH, Kolijn PM, Vlaanderen J, Rahman ML, Birmann BM, Barupal D, Lan Q, Rothman N, Walker DI. The need for a cancer exposome atlas: a scoping review. *JNCI Cancer Spectr.* 2025 Jan 3;9(1):pkae122. doi: 10.1093/jncics/pkae122. PMID: 39700422; PMCID: PMC11729703.

Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(12):2144–51.

Yu, F., Li, J., Chen, H., Fu, J., Ray, S., Huang, S., Zheng, H., & Ai, W. (2011). Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*, 30(18), 2161–2172. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.591>

Yun Li, Huajun Zhang, Yulia Merkher, Lin Chen, Na Liu, Sergey Leonov and Yongheng Chen. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. Li et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2022) 15:121 <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0>

Z. Zhang, N. Qiu, J. Yin, J. Zhang, H. Liu, W. Guo, M. Liu, T. Liu, D. Chen, K. Luo, H. Li, Z. He, J. Liu, G. Zheng, SRGN crosstalks with YAP to maintain chemoresistance and stemness in breast cancer cells by modulating HDAC2 expression, *Theranostics* 10 (2020) 4290–4307

Zagami P. and Lisa Anne Carey. Triple negative breast cancer: pitfalls and progress. *Npj Breast Cancer* 2022

Zalcberg, J.; Hu, X.; Slater, A.; Parisot, J.; El-Osta, S.; Kantharidis, P.; Chou, S.; Parkin, J. MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000, 3, 66–75.

Zhang L, et al. Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple negative breast cancer: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:357485.

Zhang L, Liu L, Xu X, He X, Wang G, Fan C, Zheng Q and Li F: miR-205/RunX2 axis negatively regulates CD44+/CD24- breast cancer stem cell activity. *Am J Cancer Res* 10: 1871-1887, 2020.

Zhou, P. et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 16, 52 (2017).

Zhu, L. et al. Characterization of stem-like circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Diagnostics* 10, 305 (2020).

Zong Yu, Mark Pegram. Research advances and new challenges in overcoming triple-negative breast cancer. *Cancer Drug Resist* 2021;4:517-42

**Durante esta tesis, se produjeron los trabajos que se enumeran a continuación:**

## PAPERS

Manuscrito en preparación:

RUNX TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY PROMOTES A PHENOTYPIC FINGERPRINTING OF DRUG RESISTANCE IN HUMAN TNBC CELL LINES. **Sofía María Sosa**, Facundo Luis Couto, Lucia Escobar, Natalia Brenda Fernández & Natalia Rubinstein.

RUNX1 is regulated by androgen receptor to promote cancer stem markers and chemotherapy resistance in triple negative breast cancer.

NB Fernández, **SM Sosa**, JT Roberts, MS Recouvreux, L Rocha-Viegas, JL Christenson, NS Spoelstra, FL Couto, AR Raimondi, JK Richer & N Rubinstein<sup>#</sup>. *Cells*; 2023 - Special Issue: RUNX Family in Cancer. <https://doi.org/10.3390/cells12030444>

## POSTERS

“RUNX1 transcriptional activity favors a fingerprint of drug resistance in TNBC cell lines” Sofía María Sosa, Natalia Fernández, Facundo Couto & Natalia Rubinstein. Buenos Aires Breast Cancer Symposium, Buenos Aires, Argentina, 2024.

“Antagonistic role of RUNX1 in the regulation of KLF4 gene expression in TNBC cell lines and their CSC subpopulation” Facundo Luis Couto, Sofía María Sosa, Natalia Brenda Fernández, Lucía Escobar, Ana Rosa Raimondi & Natalia Rubinstein. Reunión Anual LXVIII de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Buenos Aires, Argentina, 2023.

“RUNX1 transcriptional activity favors a fingerprint of drug resistance in TNBC cell lines” Sofía María Sosa, Natalia Fernández, Facundo Couto & Natalia Rubinstein. Reunión Anual LXVIII de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Buenos Aires, Argentina, 2023.

“Involvement of RUNX1 in CSC generation and drug resistance in TNBC cell lines” SM Sosa, N Fernández, F Couto, A Raimondi and N Rubinstein. Metastasis Research Society, Buenos Aires, Argentina, 2022.

“RUNX1 is regulated by the Androgen Receptor, a new potential way to target chemotherapy resistance Triple Negative Breast Cancer” NB Fernández, SM Sosa, FL Couto, JT Roberts, NS Spoelstra, AR Raimondi, JK Richer and N Rubinstein. Metastasis Research Society. Young Investigator Travel Award (oral presentation) Buenos Aires, Argentina, 2022.

“The androgen receptor regulates Runx1, a new potential way to target chemotherapy resistant triple negative breast cancer” N Fernández, SM Sosa, J Roberts, J Richer and N Rubinstein, en la Reunión Anual LXVI de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Buenos Aires, Argentina, 2021.

“Involvement of Runx1 in drug resistance on TNBC subtype” SM Sosa, N Fernández, F Couto, A Raimondi and N Rubinstein, en la Reunión Anual LXVI de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Buenos Aires, Argentina, 2021. Presentadora de póster.

“Regulation of Runx1 by androgen receptor, a new potential mechanism of TNBC progression” N Fernández, SM Sosa, J Roberts, J Richer and N Rubinstein, Buenos Aires Breast Cancer Symposium, Buenos Aires, Argentina, 2021.

“Runx1 participation on TNBC” SM Sosa, N Fernández, P Casais Onaindia and N Rubinstein, Buenos Aires Breast Cancer Symposium, Buenos Aires, Argentina, 2021. Presentadora de póster.

“Runx1 participation in chemotherapy resistance on TNBC” SM Sosa, N Fernández, P Casais Onaindia and N Rubinstein, en la LXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Argentina, 2019. Presentadora de póster.

“Regulation of RUNX1 in triple negative breast cancer” SM Sosa, MS Recouvreux, V Dansey, S Rodriguez-Segui, PC Echeverría and N Rubinstein, en Mammary Gland Gordon Conference, Italia, 2018.

“Runx1 gene expression regulation in triple negative breast cancer” SM Sosa, MV Dansey, S Rodriguez Segui and N Rubinstein, en la LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2017. Presentación en formato mini-oral.

“Runx1 participation in epithelial mesenchymal transition in breast cancer” SM Sosa, MS Recouvreux, L Rocha-Viegas, PN Echeverría and N Rubinstein, en la LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Argentina, 2016. Presentadora de póster.

## PREMIOS

11/2021: Mejor e-poster presentado en la sesión 11 de Oncología en la Reunión Anual LXVI de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), 2021.

## **Esta tesis fue financiada por los siguientes fondos públicos:**

### BECAS

04/2018 - 04/2024: **Becaria doctoral CONICET.** Beca en temas estratégicos: medicina de precisión. Título del proyecto: “Estudio de la participación de RUNX1 en cáncer de mama triple negativo”. Dirección:

Natalia Rubinstein. Lugar de trabajo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (ib3) (UBA).

08/2017 - 04/2018: **Becaria del Instituto Nacional del Cáncer.** Beca: Investigación en cáncer 2017 para graduados. Título: "Participación de Runx1 en la generación de resistencia a quimioterapia en cáncer de mama triple negativo". Dirección: Natalia Rubinstein. Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencia (IFIBYNE) y Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular (DeFBMC) (UBA-CONICET).

## SUBSIDIOS

### **2022-2024 PICT-2020-SERIEA-02206. SUSPENDIDO LUEGO DE 1 AÑO Y MEDIO DE PAGO**

Título: Estudio de la participación de RUNX1 y KLF4 en la generación de resistencia a drogas en cáncer de mama triple negativo.

### **2022-2024 PIP 11220210100679CO CONICET.**

Título: Estudio del cross-talk entre RUNX1, AR y KLF4 como posible blanco terapéutico en cáncer de mama triple negativo resistente a quimioterapia.

**2023-2024 20020220100113BA**, UBACYT-Universidad de Buenos Aires. Título: ANÁLISIS DEL ROL DE LA PALMITOILACIÓN DE AKT EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.

Director: Matías Blaustein. **Co-directora: Natalia Rubinstein.**

**2018-2019 Instituto Nacional del Cáncer**, Ministerio de Salud. Título: Estudio de la participación de runx1 en la progresión tumoral de cáncer de mama triple negativo: implicancias en resistencia a quimioterapia y metástasis.

**2017-2019 PICT- 201-0571** Grupo en Formación, otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, "Estudio de la regulación de la expresión y actividad transcripcional de Runx1 en cáncer de mama".

**2016-2018 UBACYT Modalidad I** otorgado por UBA y titulado: Mecanismos de Regulación de la Expresión Génica que involucran Caminos Transductores de Señales y su relación con proteínas y miRNAs.

**2016-2018 Proyecto de Investigación Plurianual**, otorgado por CONICET y titulado: Carcinogénesis de la mucosa bucal: rol de KLF4 y su posible relación con la vía de señalización celular de TGF-beta