



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Leandro
Ávila Concepción

Tesis doctoral

POU1F1 COMO REGULADOR
DE LA PLASTICIDAD CELULAR
EN CÁNCER DE MAMA

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Endocrinología



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

POU1F1 como regulador de la plasticidad celular en cáncer de mama

Autor

Leandro Ávila Concepción

Director: Román Pérez-Fernández

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA



Yo Leandro Ávila Concepción con DNI 55587057J declaro no tener ningún conflicto de interés con relación a la tesis de doctorado que se presenta.

En Santiago de Compostela, a 25 noviembre de 2024

Asdo. Leandro Ávila Concepción

“Ninguna persona es una isla; la muerte de cualquiera me disminuye, porque me encuentro unido a toda la humanidad; por eso, nunca preguntes por quién doblan las campanas; doblan por ti.”

JOHN DONNE

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al profesor Román Pérez, la oportunidad invaluable que me dio, su confianza plena en mí desde el primer momento, por sus enseñanzas y por contribuir a mi formación científica, y lo más importante, a mi formación personal. A Samuel un compañero y amigo con el cual he compartido los últimos 5 años, gracias por tus enseñanzas y por poner siempre serenidad en los momentos más complicados.

Agradecer a los profesores Dr. Jorge Moscat y la Dra. María Díaz-Meco por acogerme en su laboratorio en New York. Otros muchos que también han puesto un granito de arena en este proceso; Sandruca, Anxo, Vanessa, Ángela, Blanca, Ana y los nuevos compañeros del P1L1/2.

Esta etapa no hubiera sido posible sin amigos que quedarán toda la vida Valentina, Sara, Paula, Aroa, Selene, Ceci, Eva, Vera, Joan, Alberto, Sarru y Tomas, no llevaré mejor recuerdo de este ciclo, que los momentos que hemos pasado juntos. Yaiza no me olvido de ti amiga, gracias por tantos momentos. José Manuel gracias por estar siempre dispuesto a echar una mano. Un pedazo de este mensaje también, para mis amigos que están más lejos, Carlos, Marianela, Arturo, Sussel y Javier que verlos una vez al año te llena de energía. Unas palabras especiales para mi hermano FRANK, aunque estando muy lejos tú también eres parte indispensable de este proceso, gracias por escucharme y darme consejo siempre en los momentos más oportunos.

A mis PADRES por haber sido la parte más importante de mi formación y sobre todo por los valores que me han inculcado. Por motivarme siempre para seguir adelante a mi hermana y mi cuñado. No puedo olvidarme de una persona que me ha acompañado en la última parte de este viaje NOELIA; llegaste justo a darme la serenidad y aguantar mis momentos cúspides de estrés. Gracias.

Por último quiero agradecer a GALICIA y su gente, que me acogió durante toda esta etapa, no hay lugar más bonito ni con mejor comida en el mundo.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ALDH: Aldehído Deshidrogenasa

ARN: Ácido Ribonucleico

BCSC: Células Troncales de Cáncer de Mama (en inglés, *Breast cancer stem cells*)

CD133: Prominin-1

CD24: Grupo de Diferenciación 24 (en inglés, *Cluster 24*)

CD44: Grupo de Diferenciación 44 (en inglés, *Cluster 44*)

CD49f: Subunidad alfa de la Integrina 6

CSC: Células Troncales de Cancer (en inglés, *Cancer stem cells*)

ECM: Matriz Extracelular (en inglés, *Extra Cellular Matrix*)

EMT: Transición Epitelio-Mesénquimal (en inglés, *Epithelial Mesenchymal Transition*)

EpCAM: Moléculas de adhesión de células epiteliales

ER: Receptor de Estrógenos (en inglés, *estrogen receptor*)

FDR: Tasa de descubrimientos falsa (en inglés, *false discovery rate*)

GH: Hormona Crecimiento (en inglés, *growth hormone*)

HER2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (en inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*)

kDa: Kilodaltons

PBS: Tampón fosfato salino (en inglés, *phosphate buffer saline*)

POU1F1: Factor de transcripción 1, dominio POU, Clase 1

PR: Receptor de Progesterona (en inglés, *progesterone receptor*)

PRL: Prolactina

RU: Unidades Relativas (en inglés, *relative units*)

shRNA: ARN de horquilla corta (en inglés, *short harpin RNA*)

TGF β : Factor de Crecimiento Transformante Beta (en inglés, *Transforming growth factor-beta*)

TME: Microambiente tumoral (en inglés, *tumor microenvironment*)

TNBC: Cáncer de Mama Triple Negativo (en inglés, *triple negative breast cancer*)

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa (en inglés, *tumor necrosis factor-alpha*)

TP53: Proteína Tumoral p53

TSH β : Hormona Estimulante del Tiroides, subunidad beta (en inglés, *Thyroid-stimulating hormone-beta*)

VEGFA: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (en inglés, *vascular endothelial growth factor*)

ÍNDICE

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	1
2.	RESUMEN	7
3.	INTRODUCCIÓN	13
3.1.	CÁNCER	13
3.2.	CÁNCER DE MAMA	14
3.3.	MICROAMBIENTE TUMORAL.	17
3.4.	CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS (CANCER STEM CELLS, CSC).	20
3.4.1.	Células troncales en cáncer de mama	21
3.5.	PLASTICIDAD CELULAR	23
3.6.	EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN 1, DOMINIO POU, CLASE 1 (POU1F1)	25
3.6.1.	POU1F1 en cáncer de mama	26
4.	HIPÓTESIS	31
5.	OBJETIVOS	35
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1.	CULTIVOS CELULARES	39
6.2.	PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES	40
6.2.1.	Transfecciones Transitorias	40
6.2.2.	Generación de líneas estables	40
6.2.3.	Silenciamiento génico	41
6.3.	ANÁLISIS DE ARNm	41
6.3.1.	Extracción y cuantificación de ARN	41
6.3.2.	Síntesis ADNc	42
6.3.3.	PCR cuantitativa (qPCR)	42
6.4.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	43
6.4.1.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	44
6.4.2.	Determinación de la expresión de proteínas mediante Western blot	45
6.5.	ACTIVIDAD ALDH	45
6.6.	CITOMETRÍA DE FLUJO	46
6.7.	INMUNOFLUORESCENCIA	46
6.8.	ENSAYOS DE INVASIÓN, MIGRACIÓN	47
6.8.1.	Invasión	47
6.8.2.	Ensayo de migración	48
6.9.	FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS 2D Y 3D	48

6.9.1.	Formación de Colonias	48
6.9.2.	Formación de mamosferas tridimensionales (3D)	49
6.10.	FLUJO GLUCOLÍTICO	49
6.11.	VIABILIDAD CELULAR	50
6.12.	TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA Y RADIACIÓN IONIZANTE	50
6.13.	TRATAMIENTO COMBINADO	51
6.14.	OTROS TRATAMIENTOS	51
6.15.	GENERACIÓN DE TUMORES EN RATONES INMUNODEFICIENTES (ENSAYOS DE INICIACIÓN TUMORAL)	51
6.16.	SECUENCIACIÓN MASIVA DE ARN Y ANÁLISIS	52
6.17.	ANÁLISIS DE DATOS DE TRANSCRIPCIÓN (GSEA)	53
6.18.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	53
7.	RESULTADOS	57
7.1.	GENERACIÓN DE LÍNEAS CON SOBREENPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO DE POU1F1	57
7.2.	POU1F1 EN CÉLULAS MCF-7 PROMUEVE ENRIQUECIMIENTO DE GENES RELACIONADOS CON CSCs	59
7.3.	POU1F1 REGULA EN CÉLULAS TUMORALES GENES IMPLICADOS EN BCSC	60
7.4.	POU1F1 INDUCE FENOTIPO BCSC EN CÉLULAS MCF-7 CON CAMBIOS EN CD24, CD44, CD133 Y ALDH	61
7.5.	EL BLOQUEO DE POU1F1 REDUCE LOS NIVELES ARNm DE MARCADORES BSCS Y LA ACTIVIDAD ALDH.	62
7.6.	CORRELACIÓN ENTRE POU1F1 Y MARCADORES BCSC EN TUMORES DE MAMA	64
7.7.	AISLAMIENTO DE UNA SUBPOBLACIÓN ALDH ^{high} A PARTIR DE CÉLULAS MCF-7_POU1F1	65
7.8.	MIGRACIÓN EN CÉLULAS CON SOBREENPRESIÓN DE POU1F1 Y ALDH ^{high}	67
7.9.	INVASIÓN CELULAR EN CÉLULAS POU1F1 Y ALDH ^{high}	68
7.10.	LA SUBPOBLACIÓN CD44 ^{+high} /CD24 ^{-low} Y ALDH ^{high} MUESTRA UN ELEVADO PERFIL GLUCOLÍTICO	69
7.11.	CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS 2D	70
7.12.	ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE MAMOSFERAS 3D	71
7.13.	LA SUBPOBLACIÓN ALDH ^{high} MUESTRA MAYOR RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL Y A LA RADIACIÓN	73
7.14.	LA SUBPOBLACIÓN ALDH ^{high} TIENE MAYOR POTENCIAL DE INICIACIÓN DE TUMORES EN RATONES INMUNODEFICIENTES	74

7.15.	POU1F1 ACTIVA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN IL-6/JAK/STAT3	76
7.16.	POU1F1 INDUCE EXPRESIÓN DE IL-6 Y PROMUEVE LA ACTIVACIÓN STAT3	77
7.17.	LA EXPRESIÓN DE POU1F1 EN CÉLULAS MCF-7 IMPULSA LA SEÑALIZACIÓN IL-6/ p-STAT3 PARA REGULAR LA ACTIVIDAD ALDH	79
8.	DISCUSIÓN	83
9.	CONCLUSIONES	93
10.	BIBLIOGRAFÍA	97
11.	ANEXOS	117
11.1.	CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN PARA LA MANIPULACIÓN DE ANIMALES FUNCIONES B Y C.	117
11.2.	PERMISO DEL COMITÉ BIOÉTICO PARA TRABAJO CON ANIMALES	119
11.3.	DERECHOS PARA LA PUBLICACIÓN DE FIGURAS GENERADAS EN BIORENDER	124

RESUMEN

2. RESUMEN

El factor de transcripción POU1F1, conocido por regular la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL) y la hormona estimulante del tiroides (TSH) en la hipófisis, ha sido también vinculado con inducir procesos como la transición epitelial-mesenquimal (EMT), la reprogramación metabólica o influir en el microambiente tumoral (TME) en tumores de mama.

En este estudio se analiza el papel de POU1F1 sobre la plasticidad de las células tumorales en cáncer de mama. Demostramos que POU1F1 en células tumorales de mama promueve la adquisición de un fenotipo $CD24^{-/low}/CD44^{+/high}/ALDH^{+/high}$, característico de células troncales tumorales mamarias (en inglés, *Breast Cancer Stem Cells*, BCSCs). Sobre esta población de células con sobreexpresión de POU1F1 se identificó y aisló una subpoblación con alta actividad de ALDH, que posee una mayor capacidad migratoria, invasiva, de formación de colonias (2D) y mamosferas (3D) en líneas celulares *in vitro*, y una mayor capacidad de iniciación de tumores en modelos de ratones inmunodeficientes *in vivo* y significativa resistencia a quimioterapia y radioterapia. Finalmente, demostramos la relación entre POU1F1, la desregulación de la vía de señalización IL-6/JAK/STAT3 y la elevada actividad de ALDH.

En conjunto, nuestros resultados parecen indicar que POU1F1 en células tumorales de mama induce características de BCSC, lo que contribuye a la resistencia a tratamientos y a las recaídas en la enfermedad, y que la modificación de la actividad ALDH de estas células, regulada a través IL-6/JAK/STAT3, podría constituir una posible diana terapéutica.

RESUMO

O factor de transcripción POU1F1, coñecido por regular a hormona de crecemento (GH), a prolactina (PRL) e a hormona estimulante da tiroides (TSH) na hipófise, foi tamén vinculado con inducir procesos como a transición epitelial-mesenquimal (EMT), a reprogramación metabólica ou influír no microambiente tumoral (TME) en tumores de mama.

Neste estudo analízase o papel de POU1F1 sobre a plasticidade das células tumorais en cancro de mama. Demostramos que POU1F1 en células tumorais de mama promove a adquisición dun fenotipo $CD24^{-/low}/CD44^{+/high}/ALDH^{+/high}$, característico de células troncais tumorais mamarias (en inglés, *Breast Cancer Stem Cells*, BCSCs). Sobre esta poboación de células con sobreexpresión de POU1F1 identificouse e illouse unha subpoboación con alta actividade de ALDH, que posúe unha maior capacidade migratoria, invasiva, de formación de colonias (2D) e mamosferas (3D) en liñas celulares *in vitro*, e unha maior capacidade de iniciación de tumores en modelos de ratos inmunodeficientes *in vivo* e significativa resistencia á quimioterapia e radioterapia. Finalmente, demostramos a relación entre POU1F1, a desregulación da vía de sinalización IL-6/JAK/STAT3 e a elevada actividade de ALDH.

En conxunto, os nosos resultados parecen indicar que POU1F1 en células tumorais de mama induce características de BCSC, o que contribúe á resistencia a tratamentos e ás recaídas en enfermidade, e que a modificación da actividade ALDH destas células, regulada a través IL-6/JAK/STAT3, podería constituír unha posible diana terapéutica.

ABSTRACT

The POU1F1 transcription factor, known to regulate growth hormone (GH), prolactin (PRL), and thyroid-stimulating hormone (TSH) in the pituitary gland, has also been linked to induce processes such as epithelial-mesenchymal transition (EMT), metabolic reprogramming or influencing the tumor microenvironment (TME) in breast tumors.

This study analyses the role of POU1F1 on tumour cell plasticity in breast cancer. We demonstrate that POU1F1 in breast tumour cells promotes the acquisition of a CD24⁻/low/CD44^{+/high}/ALDH^{+/high} phenotype, characteristic of breast cancer stem cells (BCSCs). A subpopulation of cells with high ALDH activity was identified and isolated from this population of POU1F1-overexpressing cells, which has a higher migratory, invasive, colony-forming (2D) and mammosphere-forming (3D) capacity in cell lines *in vitro*, and a higher tumour-initiating capacity in immunodeficient mouse models *in vivo* and significant resistance to chemotherapy and radiotherapy. Finally, we demonstrate the relationship between POU1F1, deregulation of the IL-6/JAK/STAT3 signalling pathway and elevated ALDH activity.

Overall, our results seem to indicate that POU1F1 in breast tumour cells induces BCSC characteristics, which contribute to treatment resistance and disease relapse, and that modification of the ALDH activity of these cells, regulated through IL-6/JAK/STAT3, could constitute a potential therapeutic target.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad compleja que se origina debido a la proliferación celular incontrolada, como resultado de diversas alteraciones en el ADN y/o una combinación de factores genéticos y ambientales. Cuando el ciclo celular se desregula, se crea un entorno en el que las células que deberían haber entrado en apoptosis continúan dividiéndose sin control, lo que da lugar a la formación de masas tumorales. Estas masas, compuestas por diversos tipos de células, son el fundamento de lo que se conoce como la enfermedad del cáncer.

El cáncer se ha convertido en la principal causa de muerte entre las personas menores de 85 años, según Siegel RL et al. (2023). Durante el año 2022, se diagnosticaron más de 19 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial. Además, en los últimos cinco años, la prevalencia de la enfermedad ha alcanzado los 53.5 millones de casos, según datos del Observatorio Global del Cáncer (GCO) de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (<https://gco.iarc.fr/en>). Estos números subrayan la gravedad y el impacto persistente del cáncer en la salud global, destacando la necesidad urgente de mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento.

Entre los tumores más frecuentemente diagnosticados se encuentran, teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de colon y el cáncer de próstata (Figura 1). No obstante, si se realiza una segregación por sexo, se observa que, en el caso de las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado y el cual produce un mayor número de muertes por año. En el caso de los hombres, el cáncer de pulmón encabeza la lista tanto en incidencia como en mortalidad.

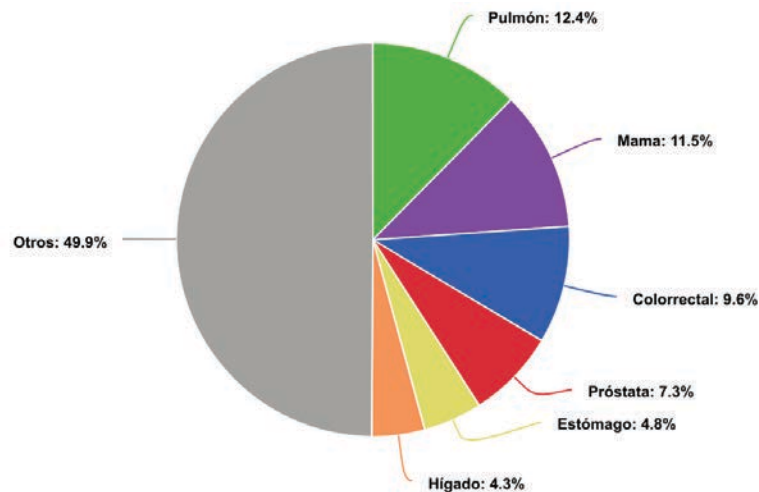


Figura 1: Gráfico circular de distribución de casos para los cánceres más comunes en 2022 para ambos sexos. Imagen generada mediante TBtools (Chen C et al., 2016).

3.2. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tumor más frecuentemente diagnosticado en mujeres. En 2020, se estima que se diagnosticaron 2,3 millones de casos de cáncer de mama femenino en todo el mundo, y alrededor de 685.000 mujeres murieron a causa de la enfermedad. Asimismo, se estima que para el año 2040 el número de casos diagnosticado aumente alrededor de un 40%, pudiendo llegar a alcanzar los 3 millones de casos anuales (Arnold M et al., 2022). Desde la década de 1970, la clasificación y el tratamiento del cáncer de mama han evolucionado significativamente gracias al uso extensivo de marcadores tumorales identificados por inmunohistoquímica, y también gracias al análisis de factores como el tamaño y grado del tumor, afectación ganglionar, y márgenes quirúrgicos. Este enfoque ha permitido la identificación de biomarcadores y la diferenciación de tumores en subtipos basados en el estado de los receptores hormonales y de crecimiento celular. En la clínica, el método clásico de clasificación de tumores de mama se basa en el análisis de receptores hormonales, como el receptor de estrógenos (ER, por sus siglas en inglés de *estrogen receptor*), el receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés de *progesterone receptor*) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, por sus siglas en inglés de *human epidermal growth factor receptor 2*), también llamado ErbB2 (por sus siglas en inglés, *erythroblastic oncogene B*), junto con el marcador de proliferación celular Ki67 (Tabla 1).

Tabla 1: Subtipos clínicos en función de receptores ER, PR y HER2.

Receptores	Subtipo clínico	Características
ER+	Luminal A	ER+, PR+, HER2-. Representa aproximadamente el 45% de los tumores y tienen bajo índice de proliferación Ki67 y alto nivel de expresión genes luminales.
	Luminal B	ER+, PR ₊ , HER2-. Son el 25% con elevada expresión de Ki67 y baja expresión de genes luminales. ER+, PR ₊ , HER2+. Representan menos del 10% y tiene elevada expresión de Ki67, elevada expresión genes luminales.
HER2+	HER2 +	ER-, PR-, HER2+. Representan el 5%, presentan elevada expresión Ki67, mutaciones frecuentes en <i>TP53</i> .
TNBC	TNBC	ER- PR- HER2-. Representan entre el 10-15% y tienen elevada expresión de Ki67. Altamente agresivos y con capacidad metastásica.

Actualmente la creación de perfiles moleculares basados en ARN ha revolucionado nuestro entendimiento sobre la heterogeneidad del cáncer de mama, influyendo significativamente en cómo los pacientes son clasificados y cómo se eligen los tratamientos. A raíz de diversas investigaciones innovadoras en perfiles de expresión utilizando microarrays, se han identificado 5 subtipos moleculares primarios, esenciales para orientar las estrategias de intervención: 1) Luminal A, 2) Luminal B, 3) HER2 enriquecidos (Her2-E), 4) Basal-like, y 5) Claudin-low (Herschkowitz JI et al., 2007; Perou CM et al., 2000; Sørlie T et al., 2001).

1) Luminal A: Son típicamente tumores ER+ y PR+, que expresan genes de tipo luminal, como receptor de estrógenos 1 (*ER1*), proteína de unión GATA (*GATA39*), proteína de unión a X-box1 (*XBPI*) y el factor de transcripción *forkhead box A1* (*FOXA1*). Poseen una mayor supervivencia libre de recaídas y una mayor supervivencia general después del tratamiento, en comparación con todos los demás subtipos de cáncer de mama.

2) Luminal B: Son tumores ER+, los cuales exhiben una menor expresión de genes luminales, como PR, y una mayor expresión de los genes de proliferación, incluyendo el marcador Ki67. Expresión frecuente de HER2 y EGFR.

3) HER2-E: Los tumores con elevada expresión de HER2 representan entre el 15-20% de los casos de cáncer de mama y se distinguen por la amplificación HER2/ErbB2 en el cromosoma 17q12 y la expresión de grado medio en la expresión de genes tipo luminales.

Aunque existe una gran superposición entre los tumores clasificados como subtipo molecular HER2-E y aquellos que son HER2+ según criterios clínicos, no todos los tumores que son HER2+ a nivel clínico pertenecen al subtipo molecular HER2-E (Prat J et al., 2014).

4) *Basal-like*: Representan el 15 % de los casos. Estos tumores son altamente proliferativos y muestran una expresión aumentada de citoqueratinas basales y EGFR y una baja expresión de genes tipo luminal. Además, se caracterizan por una alta inestabilidad cromosómica y tienen una fuerte asociación con las mutaciones *BRCA1* de la línea germinal. Aproximadamente el 80% de los tumores basales son TNBC, es decir no expresan PR, ER ni HER2. Aunque tienen un elevado nivel de agresividad y proliferación cerca del 40% de los pacientes que padecen el tipo de tumores basal-like muestran una mayor sensibilidad a la quimioterapia (Rouzier R et al., 2005).

5) *Claudin-low*: Se trata del subtipo menos frecuente. Los tumores con baja expresión de claudina suelen ser tumores triple negativos que presentan una baja expresión de marcadores de proliferación, proteínas de adhesión y genes de diferenciación luminal. Además, el perfil bajo de claudina muestra un enriquecimiento en características mesenquimales y una mayor infiltración de células inmunes. Este subtipo está altamente representado entre los carcinomas metaplásicos y medulares, y muestra una baja sensibilidad a la quimioterapia (Prat A et al., 2010).

En resumen, los subtipos Luminal A, Luminal B y *Claudin-low* muestran mejores tasas de supervivencia en los primeros 60 meses, mientras que *Her2*, y *Basal-like* reflejan un peor pronóstico (Figura 2), destacando la necesidad de tratamientos más específicos y eficaces para estos últimos subtipos. Los tumores positivos para los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR) como pueden ser los luminal A y B suelen estar asociados con mejores pronósticos de supervivencia en comparación con tumores negativos para estos receptores. Esto se debe en gran parte a su mayor sensibilidad a terapias hormonales, como el tamoxifeno o los inhibidores de aromataza, que reducen el crecimiento tumoral al bloquear o disminuir la estimulación hormonal de las células cancerígenas.

La incorporación de marcadores genéticos adicionales, como proteína de tumor 53 (*TP53*), *NDRG1* (en inglés, *N-Myc Downstream Regulated 1*), antígeno carcinoembrionario (*CEACAM5*), transportador *SLC7A5*, y la metiltransferasa 2 (*HTF9C*) ha mejorado las estrategias de diagnóstico y tratamiento; destacando cómo la sobreexpresión de estos

marcadores puede acelerar la proliferación celular y empeorar el resultado clínico (Ring BZ et al., 2006; Viale G et al., 2008).

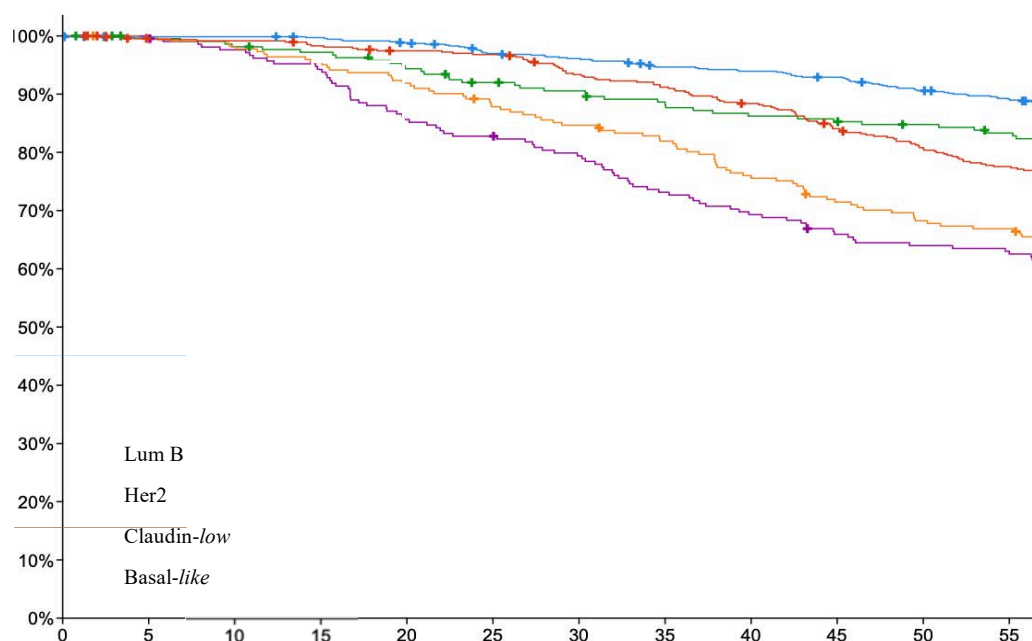


Figura 2. Curva de supervivencia basada en la base de datos METABRIC (n=1608), generada a partir de cBioPortal.

3.3. MICROAMBIENTE TUMORAL.

El microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME por sus siglas en inglés) es el entorno generado alrededor de las células tumorales formado por diferentes tipos celulares, que exhibe un altísimo grado de complejidad y que se encuentra en constante evolución. Entre los principales elementos celulares que podemos identificar en este TME están los fibroblastos, células endoteliales, células del sistema inmune (como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, *natural killer (NK)*, células inmunosupresoras derivadas de la médula ósea (MDSC), los linfocitos T/B o las células presentadoras de antígenos (APC, *antigen-presenting cells* por sus siglas en inglés). En el TME también se incluyen las llamadas células troncales cancerosas (CSC, por sus siglas en inglés de *Cancer Stem Cell*). Este es un subgrupo de células dentro del tumor que tienen algunas características similares a las células troncales normales (SC, por sus siglas en inglés de *Stem Cells*) incluyendo la capacidad de autorrenovación y de

diferenciación en diferentes tipos de células dentro del tumor. El TME, en su esencia, es el entorno celular en el que se encuentran todos estos tipos celulares y está también implicado en la progresión del cáncer a través de diferentes mecanismos de cooperación. (Figura 3) (Hinshaw DC et al., 2019).

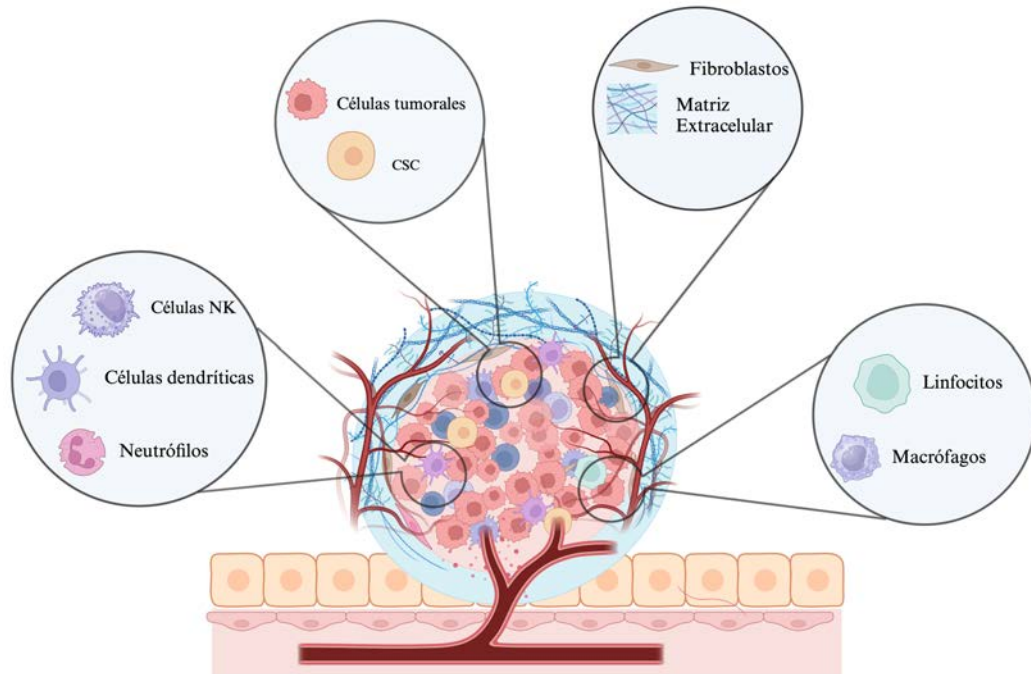


Figura 3: Diferentes células del microambiente tumoral colaboran con las células tumorales para inducir la progresión tumoral. Imagen generada en Biorender.

Fibroblastos: En el desarrollo de su fisiología natural los fibroblastos son los principales encargados de la producción y remodelación de la matriz extracelular (Sahai E et al., 2020). Estos tienen un papel fundamental en la reparación de tejidos y participan activamente en el mantenimiento y supervivencia de las células troncales epiteliales (Brizzi MF et al., 2012). En el contexto tumoral, han sido descritos los fibroblastos asociados a cáncer (*Cancer Associated Fibroblasts*, CAF por sus siglas en inglés), que poseen propiedades diferentes a los fibroblastos normales (Olumi AF et al., 1999). Muchos estudios explican la aparición de estos fibroblastos a través de diferentes mecanismos, como señales inflamatorias (interleucinas 1 y 6, IL-1 e IL-6, o TNF), daño del ADN, remodelación de la matriz extracelular, o estrés físico con la aparición de ROS (Amatangelo MD et al., 2005; Erez N et al., 2010; Sanz-Moreno V et al., 2011). Algunas de las funciones descritas de los CAF son la secreción de factores solubles como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), exosomas, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y *Growth Arrest-Specific 1* (GAS) que inducen crecimiento tumoral e invasión a tejidos

(O'Connell JT et al., 2011; Cazet AS et al., 2018). Además, se ha documentado la interferencia de estos con la función de células T a través de la producción de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2), el factor derivado de estroma 1 (CXCL12) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Fearon DT et al., 2014; Flint TR et al., 2016).

Células del sistema inmune: Además de las células tumorales y fibroblastos, el tejido tumoral se caracteriza por la infiltración de células del sistema inmune según el estado y la progresión tumoral. Un ejemplo son los macrófagos, que son reclutados en forma de monocitos desde la médula ósea a través de la señalización de diferentes quimioquinas (Qin L et al., 2014). Específicamente, en el TME está potenciada la aparición de macrófagos tipo M2, también llamados TAM (en inglés, *tumor-associated macrophages*), a través de mecanismos como la hipoxia o la secreción de IL-4 (Nicole M et al., 2020). Estos TAM contribuyen al crecimiento del tumor y pueden constituir hasta el 50% de la masa tumoral (Kim J et al., 2016). Un alto grado de infiltración de macrófagos en algunos tumores, incluidos tumores de mama, se relacionan con un peor pronóstico (Zhao X et al., 2017). Por otra parte las células dendríticas constituyen la unión principal entre la inmunidad innata y adaptativa. Su función principal es estimular la secreción de citoquinas, reconocer, capturar antígenos, y viajar a órganos linfoides secundarios para presentar estos antígenos a las células T, consiguiendo activar una respuesta inmune. En los tumores, las células dendríticas pueden encontrarse con diferentes factores supresores de su actividad, como interleucina 10 (IL-10), VEGF, o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que inhiben su maduración y afectan principalmente a una respuesta inmune de las células T (Motta M et al., 2016). Otro componente del TME son los leucocitos, su aparición depende del estado tumoral y la progresión de la enfermedad. En estadios tempranos adoptan una respuesta inflamatoria, pero con la progresión tumoral adoptan un fenotipo inmuno-supresor (Fridlender ZG et al., 2012). Además, pueden modular la inflamación a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como reconfigurar la matriz extracelular a través de la secreción de metaloproteasas de matriz como MMP-8/9 (He M et al., 2016).

Matriz extracelular (*Extracellular Matrix*, ECM, por sus siglas en inglés): Es otro de los factores determinante del TME, influyendo en la progresión tumoral y en las capacidades metastásicas. Esta estructura tridimensional implica más de 700 proteínas, que pueden modificar su abundancia, concentración, estructura y organización. Cambios en ECM impactan en la topología tridimensional de la matriz alrededor de las células, así como sus propiedades

bioquímicas y biofísicas, influyendo directamente en el destino y comportamiento celular. Un ejemplo descrito de este proceso explica como el hialuronato (HA), dependiendo de su peso molecular, puede actuar como supresor tumoral o como promotor tumoral (Bohaumilitzk L et al., 2017). Además, se ha reportado que el aumento en la deposición de proteínas como el colágeno I está asociado con una mayor formación tumoral y el desarrollo de metástasis, estableciendo un vínculo directo entre la remodelación de la ECM y la progresión agresiva de los tumores (Provenzano P et al., 2008).

3.4. CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS (CANCER STEM CELLS, CSC).

Las CSC constituyen una subpoblación celular presente en TME en diversos tumores, representando aproximadamente entre el 0.1% y el 1% de toda la masa tumoral (Tanei T et al., 2009). Esta subpoblación, aunque pequeña, es sumamente importante debido a su capacidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples tipos celulares, lo que facilita la metástasis y la formación de nuevos tumores (Brabletz T et al., 2005).

El concepto de CSC fue introducido en 1937, cuando Furth y Kahn demostraron que una única célula de leucemia murina podía iniciar un tumor en ratones (Furth J et al., 1937). Desde entonces, numerosos estudios han confirmado el potencial que poseen pequeñas subpoblaciones celulares para iniciar tumores. En 1997, se logró identificar y aislar por primera vez una CSC de leucemia mieloide aguda, logrando su posterior xenotrasplante en un ratón (Bonnet D et al., 1997). Además, diversas evidencias han demostrado las propiedades de las CSC en la progresión tumoral, metástasis y resistencia a las terapias convencionales (Brabletz T et al., 2005; Clevers H, 2011; Kreso A et al., 2014).

Se han realizado diversos estudios para comprender el origen de las CSC. Una de las teorías sobre el origen de estas células sugiere que las CSC, pueden provenir de células troncales/progenitoras normales que obtienen la capacidad de generar tumores cuando se encuentran con una mutación genética especial o una alteración ambiental (Yu Z et al., 2012). Una segunda teoría alternativa para el origen de los CSC sugiere que estas tienen origen en células somáticas normales que adquieren características de células troncales y un comportamiento maligno a través de alteraciones genéticas. Con relación a esto, se ha demostrado que la inducción de EMT en células epiteliales mamarias humanas immortalizadas

induce la adquisición de rasgos mesenquimales y la expresión de marcadores de células (Mani SA et al., 2008). La tercera teoría ha propuesto el origen de las CSC en las células tumorales que pasan por diversos procesos de reprogramación incluidos la EMT. Estudios han demostrado la existencia de células tumorales que pueden adquirir características de CSC mediante la desdiferenciación hacia un estado similar al de las células troncales embrionarias a través de la activación de un programa EMT (Hendrix MJC et al., 2003). Diferentes investigaciones han propuesto un modelo basado en el rastreo de linaje que explica el origen de las CSC en ciertos tipos de tumores sólidos (Driessens G et al., 2012; Kozar S et al., 2013). En particular, se ha descrito como las CSC pueden formarse a partir de mutaciones en diferentes adenomas (Schepers AG et al., 2012).

3.4.1. Células troncales en cáncer de mama

Las células troncales del cáncer de mama (BCSC, por sus siglas en inglés de *breast cancer stem cells*) son un tipo específico de CSC que se encuentran en los tumores de mama. Estas células fueron identificadas y aisladas por primera vez en 2003 utilizando como marcadores la glicoproteína de superficie celular (CD44), la molécula CD24 (CD24) y la ausencia de proteínas superficie de linaje (Lin⁻). El fenotipo CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ mostró la capacidad que tenían estas células de generar tumores heterogéneos en ratones inmunodeficientes (Al-Haji M et al., 2003). Posteriormente, se describió la habilidad de estas células para auto-renovarse, proliferar ampliamente y formar mamosferas clonales (Ponti D et al., 2005). Además de CD44, CD24 y Lin⁻, en los últimos 20 años se han descrito otros marcadores BCSC adicionales según los distintos tipos de tumores mamarios, como prominina-1 (CD133), molécula de adhesión celular Epitealial (EpCAM), integrina $\alpha 6$ (CD49f), antígeno de estadio temprano (SSEA-3), mucina-1 (Muc1), nectina-4 (Nectin-4), molécula CD70 (CD70), y aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1). Esta última ha sido ampliamente descrita, y se ha identificado además como un predictor de pronóstico desfavorable en pacientes. (Zhang X et al., 2020).

De forma consistente hay tres biomarcadores principales para la identificación de las BCSC, que son: CD44, CD24 y ALDH1. A estos se les atribuyen responsabilidad en el proceso de iniciación de tumor, proliferación, metástasis y resistencia a fármacos (Lawson D et al., 2015; Palomeras S et al., 2018). CD24 es una sialoproteína que participa en procesos de

adhesión celular. Una baja expresión de CD24 ha sido relacionada con procesos de radio y quimioresistencia en diferentes líneas celulares (Crabtree JS et al., 2018). CD44 es una glicoproteína transmembrana, principal receptor de hialuronato y su elevada expresión se ha relacionado con el mantenimiento de multipotencia en las BCSC (Pham P et al., 2011). Además, se ha descrito su posible empleo como un blanco para la terapia de diferentes tumores (Song J et al., 2019; Li Y et al., 2019). Por último, ALDH es una enzima encargada de la catálisis oxidativa de los sustratos de aldehídos endógenos y exógenos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, dependiente de NAD(P)⁺. En el genoma humano se han descrito al menos 19 isoformas de esta enzima, su función y su expresión diferencial dependiente del tejido. Aunque diversas isoformas (ALDH1A1, ALDH1B1, ALDH3A1, ALDH3B1) se han asociado a diferentes procesos biológicos tumorales (Tomita H et al., 2016), ALDH1A1 es la isoforma predominante en mamíferos. En células no tumorales, ALDH1A1 ha sido definida como un marcador de células troncales hematopoyéticas aisladas de médula ósea y de células troncales neuronales (Gentry T et al., 2007; Traore M et al., 2007). Múltiples estudios (Sjöström M et al., 2015; Allison S et al., 2017; Wang Q et al., 2018; Liu C et al., 2021) han descrito a ALDH1A1 como un marcador de BCSC, y han demostrado su relación con un peor pronóstico en el tratamiento del tumor y el grado de aparición de metástasis. En tumores de mama, altos niveles de ALDH1A1, se asocian significativamente con angiogénesis tumoral a través de una regulación positiva de factores proangiogénicos como VEGF (Ciccone V et al., 2018). Se ha demostrado que la sobreactividad enzimática de ALDH1A1 disminuye el pH intracelular de las células de cáncer de mama, activando la vía de señalización TAK1-NFκB. Esto aumenta la secreción de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), induciendo la expansión de MDSC y reduciendo la inmunidad antitumoral, facilitando así la progresión del cáncer de mama (Liu C et al., 2021).

Además de los marcadores previamente descritos, se han identificado otros marcadores que están directamente asociados con subtipos tumorales de mama, como CD133, EpCAM⁻ y CD49F⁺. Una alta expresión del marcador CD133 se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes con tumores invasivos (Joseph C et al., 2019). Por otro lado, los marcadores de células progenitoras epiteliales EpCAM⁻/CD49F⁺ se han asociado con una menor supervivencia global y una menor supervivencia libre de enfermedad (Ye F et al., 2015).

Otra de las características relevantes de las BCSC es su potencial evasión de tratamientos convencionales a través de diferentes estrategias. Uno de estos mecanismos, que ha sido

descrito como latencia tumoral, permite a las células entrar en una fase G0 para evadir la quimioterapia, que actúa sobre el ciclo celular. Este estado de latencia tumoral también incluye la EMT y su proceso inverso (Steinbichler TB et al., 2018). Otra estrategia que emplean las BCSC para resistir la quimioterapia y la radioterapia es la modificación de su metabolismo celular. Estos tratamientos generan en las células un exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS), que causan daño celular. Sin embargo, las BCSC, mediante la activación glucolítica, pueden mejorar la capacidad antioxidante y proporcionar a las células de NADPH, un antioxidante que neutraliza los radicales libres y protege a las células de ROS (Chen K et al., 2021).

Otro de los mecanismos de escape de estas células a la quimioterapia es conocido como el eflujo de fármacos a través de la familia de transportadores ABC (por sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette*). Entre estos transportadores destaca la proteína ABCG2 (conocida como BCRP, por su siglas en inglés, *breast cancer resistance protein*) relacionada con un fenotipo CSC, que le permite a las células unirse a distintos sustratos, hidrolizar ATP, y expulsar metabolitos y fármacos fuera de las células, contribuyendo así a su resistencia a los tratamientos (An Y et al., 2009).

3.5. PLASTICIDAD CELULAR

Puede definirse como la habilidad que poseen las células de moverse a través de un espectro fenotípico y adoptar diferentes procesos de diferenciación (Yuan S et al., 2019). Bajo ciertas circunstancias, la plasticidad celular sirve como proceso de adaptación a tejidos o regeneración celular, pero también puede facilitar ciertos aspectos relacionados con la progresión tumoral. Los cambios pueden ocurrir a nivel celular y son conocido como transdiferenciación, o a nivel de tejido donde se conocen como metaplasia. Estos, pueden ocurrir como respuesta a diferentes daños o procesos de inflamación, pero en múltiples órganos se han asociado con una predisposición al cáncer (Merrel AJ et al., 2016). Durante los últimos años se ha relacionado estrechamente el proceso de la plasticidad celular con las CSC, es decir, como diferentes transiciones fenotípicas pueden aparecer en los tumores para generar nuevos subtipos celulares en respuesta a estímulos apropiados (Batlle E et al., 2017).

El ejemplo mejor conocido de plasticidad fue descrito por primera vez por Elizabeth Hay como “*Transformación Epitelial-Mesenquimal*” (Hay ED, 1995) y es denominado hoy en día como transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés de *Epithelial-Mesenquimal Transition*). En tumores, la EMT refleja el grado del tumor y se vincula con la disociación del tumor primario y su extravasación en los vasos sanguíneos (Thiery JP et al., 2009). Esta EMT es regulada por factores de transcripción como SNAIL, TWIST y ZEB, que reprimen genes epiteliales e inducen genes mesenquimales. La pérdida de E-cadherina es considerado un sello distintivo de la EMT (Lamouille S et al., 2014). Además, las células pueden exhibir características tanto epiteliales como mesenquimales simultáneamente, lo que es conocido como estados parciales de EMT. En tumores de mama triple negativos se han identificado células tumorales circulantes (CTC, por sus siglas en inglés de *Circulant Tumor Cells*) con un amplio rango de fenotipos EMT (Khoo BL et al, 2015), que evidencian el potencial de colonización en tejidos distantes. Estos diferentes fenotipos de EMT pueden favorecer la adquisición de propiedades “*stemness*” o características de células troncales. En algunos tumores, la EMT se ha asociado con la adquisición de un perfil de células troncales/CSC CD44^{high}CD24^{low} (Mani SA et al., 2008). Estos estados intermedios, además, pueden facilitar la migración colectiva de células tumorales y aumentar su competencia metastásica. Algunas vías como miR-200/ZEB, que controla la regulación de EMT, también están involucradas en la regulación de las características de células troncales (Lim Y et al., 2013).

La ECM desempeña también un papel fundamental en la regulación de la plasticidad de las células tumorales, actuando como un entorno dinámico que influye directamente en la conducta del tumor (Kumar S et al., 2009). Los componentes de la ECM, como las proteínas y las enzimas, son cruciales para inducir cambios en las células tumorales. Por ejemplo, el TGF- β , secretado dentro de la ECM, promueve EMT, un proceso clave para la invasión y metástasis de las células cancerosas (Yu Y et al., 2014). Además, las enzimas remodeladoras de la ECM facilitan la descomposición y reorganización de la matriz, permitiendo la invasión tumoral (Liguori M et al., 2011). Factores adicionales, como las citoquinas y otros mediadores liberados en la ECM, también juegan un papel importante en la promoción de la plasticidad celular y la progresión del cáncer (Nieman KM et al., 2011; Carter JC et al., 2012).

Por último, la plasticidad celular ha sido identificada como un mecanismo clave mediante el cual las células tumorales pueden evadir diversas terapias (Boumahdi S et al., 2020). Un

ejemplo temprano de este fenómeno fue observado en casos raros de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en los que el tumor se transformó en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) después del tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Sequist LV et al., 2011). Además, se han documentado casos en los que las células de cáncer de próstata pueden trans-diferenciarse hacia un fenotipo neuroendocrino, que es resistente a los inhibidores del receptor de andrógenos (AR), a través de la cooperación entre los genes Rb1 y Trp53 (Ku SY et al., 2017). Este tipo de plasticidad representa un desafío significativo para el tratamiento efectivo del cáncer, ya que permite a las células tumorales adaptarse y sobrevivir frente a las terapias dirigidas.

Comprender estos procesos es fundamental para desarrollar terapias innovadoras que apunten a los reguladores de la plasticidad celular en el cáncer (Poltavets V et al., 2018). Por este motivo, se han propuesto diversas estrategias para evitar el cambio fenotípico, incluyendo el uso de dosis intermitentes, la combinación de terapias convencionales con quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, y la supresión de vías de señalización que interfieren en la aparición de nuevas identidades celulares (Boumahdi S et al., 2020).

3.6. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN 1, DOMINIO POU, CLASE 1 (POU1F1)

POU1F1, también conocido como Pit-1, es un factor de transcripción ubicado en el cromosoma 3 que codifica una proteína de 291 aa (Bodner M et al., 1988). Es uno de los factores de transcripción de la familia de POU compuesta por 3 miembros: PIT-OCT-UNC (Herr W et al., 1988). Los tres juegan un papel clave en la inhibición y promoción de la proliferación de linajes celulares, así como en la regulación de la migración celular, la supervivencia y la diferenciación terminal (Castrillo JL et al., 1991; Gaiddon C et al., 1999). POU1F1 se expresa por primera vez a los 21 días de la embriogénesis en bolsa de Rathke y regula los genes que codifican para la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL) y la hormona estimulante de la tiroides beta (TSH β), para dar origen a tres tipos celulares nuevos, células somatotropas, lactotropas y tirotropas (Li S et al., 1990). Por tanto, POU1F1 juega un papel fundamental tanto en la diferenciación celular durante la organogénesis de la hipófisis anterior, como en la transcripción hipofisiaria de genes fundamentales en el desarrollo sistémico. En modelo de

ratón, la disminución de los niveles de POU1F1 conduce a procesos de hipoplasia y enanismo, determinados por la reducción de los niveles hormonales de GH, PRL y TSH (Li S et al., 1990).

Recientes estudios han demostrado que POU1F1 también está involucrado en la regulación de células troncales y progenitoras en la glándula hipofisiaria. Se ha señalado la interacción entre POU1F1 - *Zinc finger E-box-binding homeobox2* (Zeb2) y las vías de señalización de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en el mantenimiento de las propiedades de las células troncales hipofisiarias. Se encontró que Zeb2 es un regulador crítico que modula la señalización BMP, esencial para la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hipofisiarias (Winningham AH et al., 2023).

Aunque es reconocido principalmente por su papel fundamental en el desarrollo y la función de la glándula hipofisiaria, múltiples investigaciones han ampliado nuestra comprensión de POU1F1, revelando su participación significativa en varios tipos de cáncer, particularmente en la progresión del tumor, metástasis y regulación del microambiente tumoral.

3.6.1. POU1F1 en cáncer de mama

La expresión del gen POU1F1, ha sido identificada en tejidos extrahipofisarios, como la placenta y el tejido hematopoyético (Delhase M et al., 1995). En el tejido mamario normal, también se ha descrito la expresión de este gen, demostrando que la expresión de POU1F1 en tejido tumoral de mama es significativamente mayor en comparación con el tejido mamario sano (Gil-Puig C et al., 2002 y 2005). De hecho, la sobreexpresión de POU1F1 en líneas celulares de cáncer de mama, como MCF-7, incrementa la producción de hormona de crecimiento (GH) y proliferación celular (Gil-Puig C, et al., 2005.), lo que ha sugerido una relación directa entre POU1F1 y la proliferación celular en cáncer de mama, al igual que ocurre en la glándula hipofisaria (Castrillo JL et al., 1991).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la sobreexpresión o el silenciamiento de POU1F1 en líneas celulares de cáncer de mama humano inducen cambios fenotípicos significativos en la expresión de proteínas involucradas en la proliferación celular, apoptosis e invasión. Algunos de estos efectos pro-tumorales de POU1F1 parecen estar mediados por la regulación de SNAIL, un inductor de EMT en tumores. Tanto en líneas celulares tumorales como en ratones inmunodeficientes la sobreexpresión de POU1F1 induce crecimiento tumoral

y promueve la metástasis. Además, en pacientes con carcinoma ductal invasivo de mama se ha descrito una correlación entre la elevada expresión de POU1F1, la expresión de *SNAIL* y la aparición de metástasis a distancia (Ben-Batalla I et al., 2010). Por lo que POU1F1, de forma independiente y también a través de *SNAIL*, modifica la expresión de proteínas implicadas en EMT y motilidad celular. En el caso de tumores mamarios, otros autores han relacionado elevados niveles de expresión de POU1F1 con un peor pronóstico de supervivencia y tratamiento del tumor (Gao Z et al., 2016).

Se ha estudiado también el papel POU1F1 en la regulación de diferentes citoquinas y quimioquinas como parte de procesos de señalización en eventos de invasión a tejidos y órganos distantes. POU1F1 regula quimioquinas como CXCL12 y su receptor CXCR4 en las células de cáncer de mama y favorece procesos de metástasis específicos en hígado y pulmón. Esto sugiere que POU1F1 podría estar involucrado en la guía de quimiotaxis durante el proceso metastásico (Martinez-Ordoñez A et al., 2018). En relación con este hecho, ha sido descrito que estas quimioquinas también desempeñan un papel regulador en la migración celular y en la movilización de células troncales hematopoyéticas (Burger J et al., 2006).

POU1F1 participa también de forma activa sobre el desarrollo del tumor a través de la remodelación de células presentes en el TME, como macrófagos y fibroblastos. En macrófagos, induce reclutamiento de monocitos hacia el foco tumoral, a los cuales transforma en macrófagos, y estos, a su vez, se polarizan hacia un fenotipo pro-tumoral. Estos son los llamados macrófagos asociados al tumor (TAM, por sus siglas de *Tumor-Associated Macrophages*), que aumentan a su vez la proliferación de células tumorales, la angiogénesis y la capacidad de las células tumorales para extravasarse y metastatizar en los pulmones. La alta expresión del factor de transcripción POU1F1 y del marcador de TAMs, CD163, en tumores de mama humanos se relaciona significativamente con una peor supervivencia libre de metástasis (Seoane S et al., 2019). El efecto de POU1F1 sobre fibroblastos es indirecto. POU1F1 induce una reprogramación metabólica en las células tumorales, al regular transcripcionalmente la enzima lactato deshidrogenasa (LDHA), un factor clave en la conversión de piruvato en lactato. La sobreexpresión de POU1F1, por tanto, aumenta significativamente la expresión de genes relacionados con glicólisis y la producción de lactato en células tumorales de mama. Esto provoca un aumento de liberación de ácido láctico al TME, que a su vez activa a los NAF (siglas de *Normal-Associated Fibroblasts* – fibroblastos normales) y los transforma en CAF (siglas de *Cancer-Associated Fibroblast* – fibroblastos asociados a cáncer). Esta activación se caracteriza

por un aumento en la expresión de α -SMA (actina de músculo liso- α), un marcador clave de los CAF, y, como en el caso de los TAM, un incremento en la señalización de los CAF hacia la célula tumoral, induciendo una mayor progresión tumoral (Martinez-Ordoñez A et al., 2021).

HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

POU1F1 participa en la inducción y progresión del cáncer de mama, actuando tanto directamente sobre la célula tumoral, como a través de otros componentes del microambiente tumoral, como macrófagos y fibroblastos. Se ha descrito que POU1F1 induce la transición epitelial-mesenquimal (EMT), una forma bien definida de plasticidad celular. Además, se ha asociado la sobreexpresión de POU1F1 a un pronóstico desfavorable de los tumores de mama. Por otra parte, las BCSC se han identificado como células clave en las acciones pro-tumorales, metastáticas y de resistencia a los tratamientos en el cáncer de mama.

Por tanto, nuestra hipótesis es que POU1F1 podría favorecer la plasticidad de las células tumorales hacia un fenotipo de células similares a las células troncales del cáncer de mama (BCSC-like), promoviendo así la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos.

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

1. Analizar la función de POU1F1 en la reprogramación de células tumorales de mama en células troncales cancerosas de mama (BCSC).
2. Tras la sobreexpresión de POU1F1, aislar e identificar subpoblaciones con características similares a las BCSC.
3. Determinar el impacto funcional de la sobreexpresión de POU1F1 y de otras subpoblaciones celulares en la migración e invasión celular, en la formación de colonias y mamosferas, en la iniciación de tumores y en la resistencia a tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares de cáncer de mama humano utilizadas en este estudio fueron obtenidas, adquiridas y certificadas por la ATCC (*American Type Culture Collection*). Se emplearon dos modelos celulares:

MDA-MB-231: Esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de mama humano y está formada por células epiteliales adherentes aisladas de una mujer de 51 años. Estas células son negativas para los receptores de estrógeno (ER-), progesterona (PR-), y HER2 (HER2-), lo que las clasifica como un subtipo triple negativo (TNBC).

MCF-7: Esta línea celular también deriva de un adenocarcinoma de mama humano y está compuesta por células epiteliales adherentes, aisladas de tejido mamario de una mujer de 69 años. Estas células son positivas para los receptores de estrógeno (ER+) y progesterona (PR+), pero negativas para HER2 (HER2-), lo que las clasifica dentro del subtipo Luminal A de cáncer de mama.

HMEC: Son células epiteliales adherentes derivadas de tejido mamario humano normal. Aisladas de tejido mamario de una mujer.

Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo a una densidad de $7,5 \times 10^5$ células en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, con una humedad relativa del 95% y 5% de presión parcial de CO₂. El medio del cultivo que se utilizó fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA): con 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio (Gibco, Carlsbad, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific) y 1% de penicilina-estreptomocina (Sigma-Aldrich, Burlington, USA). Las células fueron sometidas a un control sistemático para la evaluación de presencia de micoplasma.

6.2. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES

6.2.1. Transfecciones Transitorias

Para los ensayos de transfección transitoria de POU1F1 se utilizó el plásmido de sobreexpresión pDream-CMV-POU1F1-NEO (GenScript, New Jersey, USA) (Tabla1). Se sembraron 15×10^4 células en placa de 60mm para una confluencia de entre el 70-80%. Para la transfección se empleó el reactivo Lipofectamine 2000® DNA Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se preparó una mezcla siguiendo el protocolo del fabricante que contenía, 2 μg de plásmido por cada 5 μl del reactivo.

6.2.2. Generación de líneas estables

La sobreexpresión estable de POU1F1 en la línea celular MCF-7 se llevó a cabo mediante infección lentiviral, garantizando así la máxima eficiencia posible de transducción. Se generó la línea celular MCF-7_POU1F1 (a partir de ahora línea POU1F1) utilizando un plásmido de sobreexpresión de POU1F1 (pLV-Puro-EF1A>hPOU1F1/FLAG) adquirido de Vector Builder (Chicago, USA), que contiene un clon de la ORF del gen humano POU1F1 (Tabla 2). Como control, se empleó el vector vacío (pLV[Exp]-Puro-EF1A) proporcionado por la misma empresa.

Para la infección con partículas lentivirales, se sembraron 1×10^5 células por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos, alcanzando una confluencia del 60-70%. Después de 24 h, se procedió a la infección utilizando 2 TU (*Transducing Units*, por sus siglas en inglés), equivalente a 2 partículas virales por célula. La infección se realizó en medio DMEM suplementado con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno para aumentar la eficiencia de transducción. Tras 12 h de infección, se cambió el medio para evitar la toxicidad asociada al polibreno. Posteriormente, a las 24 h de la infección, las células fueron sometidas a selección con diclorhidrato de puromicina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 5 días para asegurar la integración estable del transgén. La línea celular HMEC_POU1F1 empleada en el análisis de RNA-seq se generó empleando los mismos vectores de sobreexpresión con iguales condiciones.

6.2.3. Silenciamiento génico

Para inhibir la expresión de POU1F1 en las células MDA-MB-231 de forma estable se utilizó el plásmido POU1F1-shRNA-sc36234 (Tabla 1) que contiene tres constructos específicos entre 19-25 nt para diferentes regiones de POU1F1 (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA). Las células de control se infectaron con el vector vacío de iguales características pero que no contenían los constructos del silenciamiento (Santa Cruz Biotechnologies). Se sembraron 1×10^5 células por pocillo en multiwell 6, y se añadieron 1 TU viral por célula en 10 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno. Transcurridas 12 h se le cambió el medio y 24 h después las células se seleccionaron con diclorhidrato de puromicina 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 días.

Tabla 2: Plásmidos utilizados en transfecciones.

Plásmido	Casa comercial	Promotor	ORF	Resistencia
pDream-CMV-POU1F1-NEO	GenScript	CMV	POU1F1	Ampicilina/Neomicina
pLV-Puro-EF1A>hPOU1F1/FLAG	Vector Builder	EF1A	POU1F1/FLAG	Ampicilina/Puromicina
POU1F1-shRNA-sc36234	Santa Cruz	CMV	siARN-POU1F1	Ampicilina/Puromicina
pCDNA3.1_Hyg_CMV_fireflyLuciferase	Addgene	CMV	Luciferasa	Ampicilina/Hygromicina

6.3. ANÁLISIS DE ARNm

6.3.1. Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN total, se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizó un lavado con PBS. Se añadieron 350 μl de Trizol (Invitrogen) por cada placa de 100 mm con confluencia sobre el 80%, se separaron las células con raspador y se recogieron en viales de 1.5 ml. Se incubaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadió 350 μl de cloroformo, se agitaron vigorosamente en vortex durante 15 seg y se incubaron nuevamente durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron los viales a 12.000 g durante 15 min a 4°C, y tras la separación en varias fases transferimos la superior de interés a un nuevo vial. Se añadieron 175 μl de isopropanol. Las muestras fueron incubadas durante 30

min a -20°C y se procedió a centrifugar las muestras a 12.000 g durante 10 min a 4°C para la precipitación del ARN. Se decantó el sobrenadante sobre papel de filtro y se añadieron 750 μl de etanol frío al 75% para eliminar las sales del pellet resultante. Las muestras se centrifugaron a 7.500 g durante 5 min a 4°C , se decantó el sobrenadante y el pellet se secó durante 15 min a 25°C en campana de flujo para mantener condiciones estériles. Se disolvió el ARN en agua dietilpirocarbonato (30-50 μl según la cantidad de pellet) y se incubó 10 min a 55°C en termoblock con ciclos de vortex para una completa dilución del pellet. Para la cuantificación del ARN, se empleó el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior procesamiento.

6.3.2. Síntesis ADNc

Partiendo de la cuantificación previa de la concentración de ARN en las muestras, se preparó una mezcla que contenía: 6 μl de tampón de reacción 5X (Invitrogen), 2 mM dNTPs (Invitrogen), 200 U/ μl de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen), 250 ng de random primers (Invitrogen), 0.25 μl 40 U/ μl de inhibidor de ribonucleasa ARNsa (ARNsin, ARNsinhibitor, Promega, Madison, USA), 1 μg ARN y H_2O libre de nucleasas hasta llegar a un volumen final de 30 μl . La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador MWG Biotech Primus con condiciones precalentamiento 110°C , retrotranscripción 50 min a 37°C , amplificación de ADNc 15 min a 42°C y la desactivación 5 min a 95°C . Se congelaron las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

6.3.3. PCR cuantitativa (qPCR)

La reacción de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un volumen final de 10 μl , conteniendo la mezcla 5 μl de maxterMix Luminaris Color HiGreen (Thermo Fisher Scientific), 0.25 μl de cada cebador (10 nM), 1 μl de ADNc y 3.5 μl de agua MQ para completar el volumen. Posteriormente se realizó el sellado y la centrifugación de la placa de PCR. Se utilizó un termociclador Applied Biosystems™ QuantStudio™ qPCR Systems (Thermo Fisher Scientific) y las condiciones impuestas en el programa Real-time PCR System para realizar en todos los casos las PCR fueron: precalentamiento 10 minutos a 95°C , 40 ciclos de desnaturalización

durante 15 segundos a 95°C, hibridación durante 15 segundos a 55°C y elongación durante 40 segundos a 72°C. Se añadió una etapa de melting curve, para asegurar la amplificación de un único producto. Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Se empleó como gen de referencia para los controles de carga el ARNr 18S o GAPDH. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos a partir del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La secuencia de los cebadores utilizados se puede encontrar en la Tabla 3.

Tabla 3: Cebadores (*primers*) utilizados en la PCR tiempo real.

Genes	5' a 3'	3' a 5'
<i>POU1F1</i>	TCCTGACCACACCTTGAGTC	CTTTCCGCCTGAGTTCCTG
<i>18S</i>	GTAACCGCTTGAACCCATT	CCATCCAATCGCTAGTAGCG
<i>GAPDH</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGCTAGTAGCG
<i>CD24</i>	ACCCACGCAGATTTATTTCCA	ACCACGAAGAGACTGGCTGT
<i>CD44</i>	AAGGTGGAGCAAACACAACC	AGCTTTTTTCTTCTGCCCACA
<i>CD133</i>	TTCTATGCTGTGTCCTGGGG	GGGCCCATTTTCCTTCTGTC
<i>EpCam</i>	CTTTAAGGCCAAGCAGTGCA	CCAGTAGGTTCTCACTCGCT
<i>CD49f</i>	AGAATTGACCTCCGCCAGAA	TTTCAGCTTCAAGTGTGCCC
<i>ALDH1A1</i>	AAAGAAGCTGCCCGGAAAAG	CCCCATGGTGTGCAAATTCA
<i>IL-6</i>	CTTCAGGCCAAGTTCAGGAG	AGTGG ATCGTGGTTCGTCTTC

6.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la extracción de proteínas, se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizaron dos lavados con PBS frío. Posteriormente se añadió tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7.0, EDTA 50 mM, NaCl 140 mM, Nonidet p-40 1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas 10 µg/ml, 200 µl por cada placa de cultivos con confluencia aproximada del 80%. Se separaron las células con raspador para obtener el extracto celular que fue transferido a un vial de 1.5 ml e incubado 30 min a 4°C para asegurar una correcta lisis. Esta lisis induce degradación total de todas las membranas de las células incluyendo la membrana celular. Se centrifugó durante 10 min a 14.000 g a 4°C para separar el núcleo del resto del material celular. Se colectó el sobrenadante y se conservó a -20°C para su posterior análisis.

La cuantificación se realizó por método Bradford, donde las proteínas se unen al reactivo (Invitrogen) para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor

que el colorante libre. Se prepararon 4 tubos testigos con diferentes concentraciones de BSA (1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml) para realizar la curva de calibración, además del blanco que solo contenía agua, tampón de lisis y reactivo Bradford. Una vez preparados los tubos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm lector multiplaca LB 940 Mithras (Berthold Technologies, Shanghai, China).

6.4.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se prepararon las muestras desnaturalizando las proteínas para ser cargadas en geles de 13.5 % de poliacrilamida de dimensión 8 × 8.5 cm. En cada pocillo se aplicó un volumen de 30 µl que contenía 30 µg de proteína tratadas con tampón de tratamiento reductor 1X (250 mM Tris-Base/Tris-HCl, 8% SDS, 40% Glicerol, 8% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 6% 2-mercaptoetanol) para la ruptura de puentes disulfuro y un correcto despliegue de las proteínas de interés. Las muestras fueron calentadas en un *thermoblock* a 95°C durante 5 min.

Los geles de poliacrilamida se elaboraron en el laboratorio utilizando el Mini-Protean® System Casting Stand (BIO-RAD, Hércules, USA). Los reactivos utilizados para la preparación de los geles fueron una solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-2.7%), tampón Tris-clorhídrico 0.5 M (pH 6.8), tampón Tris-clorhídrico 1.5 M (pH 8.8), SDS (sodio dodecil sulfato) al 10 % (pH 7.2), TEMED (N,N,N',N-tetraetilendiamina, BIO-RAD) como agente iniciador de la polimerización y el anión persulfato (S₂O₈) en forma de persulfato amónico (APS, Sigma) como catalizador de la reacción de polimerización. La mezcla de los reactivos para la preparación del “gel separador” y el “gel concentrador” se realizó a 25°C y añadiendo siempre en último lugar el APS y el TEMED. Se permitió que la polimerización del gel separador transcurriera a temperatura ambiente durante unos 20-30 min y la del gel concentrador a temperatura ambiente durante 15-20 min.

Para realizar la electroforesis, se utilizó un patrón de pesos moleculares Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder compuesto 11 bandas de proteínas en el rango de 8 a 260 kDa (LICORbio, Lincoln, USA).

6.4.2. Determinación de la expresión de proteínas mediante Western blot

Después de la electroforesis, se activó la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola en metanol durante 10 minutos, seguida de un lavado con agua destilada. Las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF utilizando el método de electrotransferencia en un sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad) con una corriente de 300 mA durante 1 hora y 45 minutos. A continuación, se realizó una nueva activación de la membrana en metanol durante 1 minuto, seguida de otro lavado con agua destilada.

La membrana se bloqueó utilizando una solución de leche en polvo al 5% o BSA al 5% (para proteínas fosforiladas) durante 1 hora a 25°C. Luego, se realizaron tres lavados con PBS al 1% y Tween 20 al 0.05%, pH 7.4. Se añadió una solución Intercept T20 (LICORbio) conteniendo el anticuerpo primario en la dilución correspondiente (Tabla 3). La membrana se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con el tampón de lavado.

Se añadió una solución de PBS al 1% y Tween 20 al 0.05% que contenía el anticuerpo secundario fluorescente anti-rabbit o anti-mouse (según el caso) a una concentración de 1 µg/ml, y se incubó durante 1 hora a 25°C. Finalmente, se efectuaron tres lavados de 15 minutos cada uno para eliminar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. La detección se realizó escaneando la membrana utilizando el sistema de fluorescencia Li-Cor Odyssey (LICORbio) a longitudes de onda de 700 y 800 nm.

6.5. ACTIVIDAD ALDH

Para determinar la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), se empleó un sistema de reactivos ALDEFLUOR siguiendo su correspondiente protocolo (STEMCELL, Vancouver, Canadá). Este es un método no inmunológico para identificar células en función de su actividad de ALDH. En este caso, las células procesan un sustrato fluorescente que es específicamente oxidado por la enzima ALDH en las células vivas, produciendo un producto fluorescente detectable mediante citometría de flujo.

6.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis fenotípico de las células, se sembraron y se mantuvieron 48 h en cultivo para tener una confluencia entre 70-80%. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se añadió 1 ml de Accutassa (STEMCELL Technologies); se incubaron durante 10 minutos para asegurar una correcta disgregación. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS suplementado con 2% FBS. Se realizó el conteo de células empleando la cámara de Neubauer y se prepararon viales con densidad de 1×10^6 células en 100 μ l de volumen. Luego se añadieron los diferentes anticuerpos marcados (referenciados en la Tabla 3), y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar uniones inespecíficas. Se analizaron las muestras en el citómetro Accuri Ruo Special Ryder system BD (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) y/o citómetro CitoFlex S (Beckman Coulter). El análisis de datos se realizó en el software FlowJo versión10 con licencia # 36089/98657.

Para la separación de las subpoblaciones de interés se utilizó el “S3e Cell Sorter”(BIO-RAD). La separación se realizó en células con sobreexpresión de POU1F1 (células POU1F1) en función de la actividad ALDH (células POU1F1-ALDH^{high}). Las células fueron marcadas según el protocolo previamente descrito, y se midió la emisión de fluorescencia a 488 nm y se segregaron las células. Las células se recuperaron en FBS y se sembraron nuevamente en placas de 35 mm con cóctel de antibióticos 5% de penicilina-estreptomomicina para prevenir cualquier tipo de contaminación.

6.7. INMUNOFLUORESCENCIA

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron sobre discos de cristal que fueron tratados previamente con poli-L-Lisina 1 hora a temperatura ambiente. Los discos fueron lavados 3 veces con agua destilada y esterilizados 4 horas con luz ultravioleta. Se sembraron 2×10^4 células sobre los discos. Al día siguiente, las células fueron fijadas en etanol frío 96%, seguido de dos lavados con PBS frío. Para la permeabilización se utilizó un buffer de PBS + 0,3% triton + 0.1 M glicina durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBS frío. El bloqueo se realizó utilizando un buffer de PBST y BSA 1% durante 30 min para asegurar la unión específica de los anticuerpos. Los anticuerpos primarios fueron incubados

según la Tabla 3 en PBST 0.1% de BSA, toda la noche a 4°C. Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS frío, para posteriormente, añadir el correspondiente anticuerpo secundario en BSA1%. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS frío y un último lavado con H₂O destilada; los cristales fueron montados utilizando DePex mounting medium Gurr (VWR, Barcelona, España) que contenía DAPI para marcaje del núcleo. Las inmunofluorescencias fueron analizadas en el microscopio directo de fluorescencia vertical digital Leica DM4B (Leica, Wetzlar, Alemania).

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en citometría de flujo (CF), Western blot (WB) e Inmunofluorescencia (IF). BD: Becton-Dickinson. Sc: Santa Cruz. CS: Cell Signaling

Proteína	Técnica	Casa comercial	Concentración
POU1F1	Wb e IF	Sigma. Ref. 089K4863	1:5000
CD 24	CF	BD. Ref. 555428	1:100
CD 133	CF	BD. Ref. 566596	5 mg/ml
CD 44	CF	BD. Ref. 555478	1:1000
GPDH	WB	Sc. Ref. 32233	1:5000
β- Actina	WB	Sc. Ref. 47778	1:5000
GAPDH	WB	Sc. Ref. 32233	1:5000
p-STAT3	WB	CS. Ref. 34911	1:400
STAT3	WB	CS. Ref. 9132	1:1000
p-ERK1/2	WB	CS. Ref. 9101	1:1000
ERK1/2	WB	CS. Ref. 9102	1:1000
p-AKT	WB	CS. Ref. 9271	1:1000
AKT	WB	CS. Ref. 9272	1:1000

6.8. ENSAYOS DE INVASIÓN, MIGRACIÓN

6.8.1. Invasión

Los ensayos de invasión se realizaron empleando placas de 24 pocillos que traen incluidos insertos con poros de 8 μm de tamaño (Corning, New York, USA). Sobre los insertos se añadieron 150 μl Geltrex (Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1:8 en medio de cultivo

libre de suero, y así se genera una estructura tridimensional similar a la matriz extracelular. En el fondo de los insertos se añadió medio de cultivo suplementado con 20 % de FBS. En la parte superior de los insertos se sembraron las células 2.5×10^4 en medio DMEN sin suero. Después de 24 h de incubación, se retiró el medio de cultivo y el Geltrex de la parte superior y el medio de cultivo de la parte inferior del inserto y se fijaron las células con metanol 90% durante 30 min. Posteriormente se realizó la tinción violeta cristal y se procedió a cuantificar el número de células que atravesaron la matriz y se depositaron en el fondo de los insertos en un microscopio invertido Olympus IX73 (Olympus, Allentown, USA).

6.8.2. Ensayo de migración

Para determinar la capacidad de migración de las diferentes subpoblaciones de células se realizó un ensayo de cierre de heridas utilizando el sistema de insertos (IBIDI, Martinsried, Alemania) en placas de 35 mm. En cada pocillo/inserto se sembraron 3×10^4 células en DMEN. Después de 24 horas se retiraron los insertos y las placas se colocaron en el microscopio Widefield LeicaDMI 6000B (Leica) para realizar un *time lapse* durante 12 h y evaluar la capacidad de migración de las células.

6.9. FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS 2D Y 3D

6.9.1. Formación de Colonias

El ensayo de formación de colonias se llevó a cabo en placas de 6 pocillos donde se sembraron 100 células por pocillo de las diferentes líneas celulares en estudio. Se dejaron crecer las colonias durante 7 días y se realizaron cambios de medio periódicamente cada 48 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con metanol al 90% durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una tinción con una solución de cristal violeta (Sigma) durante 30 min seguido de tres lavados con H₂O destilada. Se dejaron secar las placas y se realizaron dos mediciones; la primera, el conteo de colonias directamente en la placa, y en la segunda se resuspendieron las colonias en 250 µl de ácido acético al 10% y se midió la

absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro multiplaca LB 940 Mithras (Berthold Technologies).

6.9.2. Formación de mamosferas tridimensionales (3D)

Para la formación de mamosferas 3D se utilizaron placas Nunclon Sphera (Thermo Fisher Scientific) de fondo cóncavo y baja adherencia. Se sembraron 500 células por pocillo de cada tipo celular. Se tomaron fotos a 1, 14 y 21 días en el microscopio de campo invertido Olympus Ix77 (Olympus). Se cuantificó el volumen de las mamosferas utilizando la fórmula $V = 3.14/6 * (L * A^2)$. Posteriormente las mamosferas fueron teñidas durante 1 h con una triple tinción Hoechst, caspasa 3/7 e Ioduro de propidio que identifican células vivas, células en apoptosis y células muertas, respectivamente. Las células fueron estudiadas en microscopía confocal de barrido (Leica Stellaris) para ver el grado de compactación y composición celular de las mamosferas en su interior. La cuantificación de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el software LAS X (Leica Stellaris) integrado en el microscopio confocal.

6.10. FLUJO GLUCOLÍTICO

La evaluación del flujo glucolítico se llevó a cabo mediante la monitorización de la tasa de acidificación extracelular (ECAR), con el Analizador de Flujo Extracelular Seahorse Bioscience XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Las células se sembraron en monocapa en microplaca de cultivo celular XF96. Previamente al ensayo, se efectuó la sustitución del medio de cultivo por un medio cuya composición consistía en medio Seahorse XF DMEM pH 7,4 sin bicarbonato y con baja capacidad de tamponamiento de pH (103575-100, Seahorse Bioscience, Agilent Technologies), suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de L-glutamina y 10 mM de glucosa. Las células se incubaron a 37°C en ausencia de inyección de CO₂. Tras un período de equilibrado de una hora en el medio de ensayo, se procedió a realizar cinco mediciones basales del ECAR. Posteriormente, se administraron secuencialmente Rot/AA seguido de 2-Desoxiglucosa (2-DG, 50mM) para la evaluación de la función glucolítica. Se cuantificó la glucólisis basal y la glucólisis compensatoria. Todos los resultados obtenidos fueron normalizados en función del contenido proteico de las muestras.

6.11. VIABILIDAD CELULAR

Los experimentos de proliferación/viabilidad celular se llevaron a cabo mediante ensayos MTT. El ensayo MTT es un método indirecto para estimar el número de células vivas. El MTT, o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de color amarillo, se reduce a formazan púrpura en las mitocondrias de las células vivas. Por consiguiente, la conversión puede relacionarse directamente con la cantidad de células viables. La absorbancia de esta solución coloreada se puede cuantificar mediante la medición a una longitud de onda de 590 nm.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células. Después de 72 h se añadió MTT (Thermo Fisher Scientific) para una concentración final en el pocillo de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubó durante 1 hora a 37°C , se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 μl de DMSO. La absorbancia fue medida a 590 nm en un lector multiplaca LB 940 Mithras (Berthold Technologies).

6.12. TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA Y RADIACIÓN IONIZANTE

Para los experimentos de tratamiento con quimioterapia las células fueron sembradas en (15×10^4) placa de 6 pocillos, formando una monocapa. Pasadas 24 h se comenzó el tratamiento con tamoxifeno (Sigma) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante un período de 72 horas. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante MTT.

En los experimentos de resistencia a la radiación, las células se sembraron (10×10^4) en placa de 6 pocillos, formando una monocapa que 24 h después tenían sobre el 80% de confluencia. A continuación, las células fueron irradiadas con una dosis simple de radiación ionizante de 10 Greys y una energía de 6 MeV (Mega electrón volt). Después de la radiación, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% de CO_2 durante 72 h para posteriormente medir la viabilidad celular mediante un ensayo MTT.

6.13. TRATAMIENTO COMBINADO

Para el tratamiento combinado se sembraron 15×10^4 células en placa de 6 pocillos. A las 24 h se trataron con una dosis de tamoxifeno (Sigma) a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ durante 72 horas. Posteriormente se les cambió el medio y se sometieron a una dosis simple de radiación ionizante de 10 Greys. Las células se mantuvieron durante 72h más en cultivo y se procedió a medir la viabilidad celular mediante un ensayo MTT

6.14. OTROS TRATAMIENTOS

El ensayo de inhibición de la fosforilación con Ag490 y Ruxolitinib (STEMCELL) llevó a cabo en placas de 100 mm donde se sembraron 1×10^6 células por placa de las diferentes líneas celulares en estudio. Las concentraciones de los inhibidores se emplearon según la recomendación del IC_{50} del fabricante de 15nM para Ag490 y 498nM Ruxolitinib, el tratamiento de una sola dosis se mantuvo durante 72 h. Pasado este tiempo se realizó extracción de ARN y proteína y se midió la actividad ALDH mediante ensayo ALDEFLUOR.

6.15. GENERACIÓN DE TUMORES EN RATONES INMUNODEFICIENTES (ENSAYOS DE INICIACIÓN TUMORAL)

Se emplearon ratones hembra de 8 semanas con inmunodeficiencia de la cepa de NRj-Foxn1^{nu/nu}. Esta cepa con origen en Janvier labs (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) fue utilizada en los estudios de xenograft con la debida aprobación del comité ético para estudios con animales de la Universidad de Santiago de Compostela (ver Anexos). Los estudios fueron realizados por el doctorando, que posee autorización para manipulación de animales de experimentación (ver Anexos). Para el estudio se emplearon tres líneas celulares MCF7, POU1F1 (células MCF-7 con sobreexpresión estable de POU1F1), y la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} (MCF-7 con sobreexpresión estable de POU1F1 y separación de la población ALDH^{high} por citometría de flujo). Utilizando estas líneas se generaron tumores subcutáneos en la cuarta glándula mamaria inoculando dos diluciones de células 5×10^2 y 5×10^3 para cada

grupo de ratones (n=7 y n=8 respectivamente). Las líneas celulares previamente fueron transfectadas con un plásmido pCDNA3.1-Hyg-CMV-fireflyLuciferase (ver Tabla 1) para realizar el seguimiento de la aparición y crecimiento tumoral. Los ratones fueron inyectados con 100 µl de luciferina en el peritoneo. Esta molécula es oxidada por la luciferasa y emite luz que puede ser visualizada en el IVIS (por sus siglas en inglés, *In Vivo Imaging System*)(Genesis, Germany). Se realizó el seguimiento durante 8 semanas y posteriormente los ratones fueron sacrificados utilizando CO₂ con posterior dislocación cervical.

6.16. SECUENCIACIÓN MASIVA DE ARN Y ANÁLISIS

El ARN total destinado a la secuenciación masiva (RNA-seq) se extrajo de células: a) MCF-7 (vector vacío), b) MCF-7_POU1F1, c) HMEC (vector vacío), d) HMEC_POU1F1 con el kit comercial *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La compañía Novogene, fue la encargada del proceso de secuenciación. Se evaluó la calidad del ARN utilizando el sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Se llevó a cabo un protocolo para eliminar el ARNr utilizando el kit RiboZero (Illumina, 20040526) antes de proceder a la preparación de las librerías de secuenciación. Los análisis de secuenciación de ARN se llevaron a cabo en la plataforma Illumina NovaSeq6000. Para garantizar la calidad de los datos, se empleó el programa FastQC (v0.11.5), utilizando la escala de Phred como estándar de referencia.

Se procedió a alinear las lecturas de alta calidad con el genoma del Humano de referencia (Ensembl GRCh38, versión 108) usando el software STAR (v2.7.6). Una vez alineadas, las lecturas se asignaron a sus transcritos correspondientes mediante el programa htseq-count (v0.13.5), con el ajuste "*intersection-nonempty*" para asegurar que cada lectura se asignara a un solo gen. La exploración de la expresión génica se realizó mediante DESeq2 (v1.32.0) en R (v4.2.2), y las matrices de datos se enriquecieron con información adicional utilizando BiomaRT (v2.52.0) en R. Esta información incluyó detalles como el nombre oficial de los genes, su ubicación cromosómica, la dirección de transcripción y otros atributos relevantes. Otros datos de RNA-seq empleados en esta tesis, se tomaron de la base datos NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

6.17. ANÁLISIS DE DATOS DE TRANSCRIPCIÓN (GSEA)

Para el análisis de enriquecimiento de los perfiles transcripcionales de las líneas celulares en estudio, se utilizó el programa GSEA (Gene Set Enrichment Analysis; v4.3.2). Se crearon los archivos de importación y se cargaron en el formato establecido. Se compararon los perfiles transcripcionales utilizando diferentes colecciones de genes y según los parámetros siguientes: estadístico de enriquecimiento-*weighted* y la métrica de clasificación de genes *T-Test*. Después del análisis se obtuvieron los gráficos de enriquecimiento con los valores NES (*Normalized Enrichment Score*) y FDR (*False Discovery Rate*).

6.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores se expresan como media \pm EEM. Las medias se compararon utilizando la prueba t de Student o realizando un análisis de varianzas (ANOVA), y utilizando test de comparación múltiple de Tukey-Kramer. La prueba de U Mann-Whitney se utilizó para datos no paramétricos con intervalos de confianza del 95 %. La significación se representa como * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ con respecto al control. La correlación entre los niveles de expresión de ARNm se calculó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El software *Rstudio* se utilizó para cálculos estadísticos. Para los experimentos de “*tumor initiating cells* (TIC)” *in vivo*, se utilizó el software “*Limiting Dilution Analysis* (LDA)” para hacer los cálculos correspondientes de frecuencia de generación de tumores. Para generar gráficos y análisis estadísticos se empleó el software GraphPad Prism versión 9.1

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CON SOBREENPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO DE POU1F1

Para llevar a cabo la sobreexpresión y el silenciamiento de *POU1F1*, se generaron líneas celulares estables mediante la infección con plásmidos empaquetados en partículas lentivirales, lo que permitió lograr una alta eficiencia de transducción en las células objetivo. Las líneas celulares seleccionadas para este experimento fueron MCF-7 subtipo luminal A, y MDA-MB-231, subtipo TNBC de cáncer de mama. Estas líneas celulares fueron elegidas debido a sus diferencias en los niveles basales de expresión de *POU1F1*, siendo MCF-7 una línea con niveles bajos de este factor de transcripción y MDA-MB-231 con niveles elevados, lo que permite evaluar el efecto de *POU1F1* en diferentes contextos biológicos de cáncer de mama. La figura 4 muestra un claro aumento de la expresión de *POU1F1* en la línea MCF-7 ($P < 0.0001$) y una disminución de la expresión en la línea MDA-MB231 ($P < 0.001$) respecto al control después de la manipulación génica.

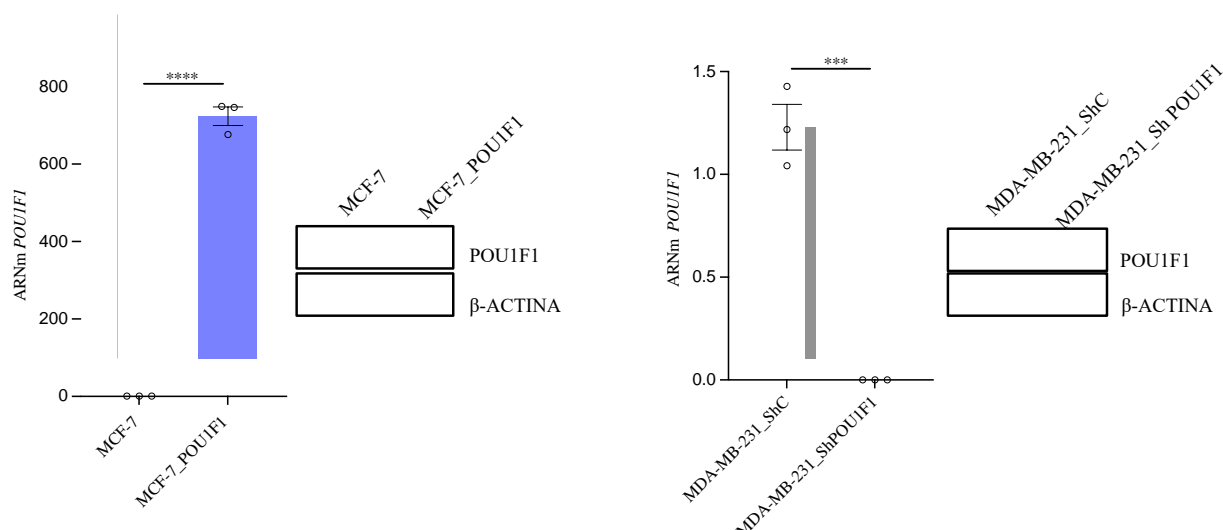


Figura 4. (A). Expresión relativa de ARNm y proteína de *POU1F1* en la línea celular MCF-7 (B). Expresión relativa de ARNm y proteína de *POU1F1* en la línea celular MDA-MB231. Los niveles de ARNm fueron normalizados a partir del gen *18S*. Los valores se representan como la media \pm EEM y fueron comparadas utilizando la prueba t-Student con una significación de *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$.

Se realizó un análisis de inmunofluorescencia para detectar la sobreexpresión y el bloqueo de POU1F1 en la región nuclear de las células, área en la que este factor de transcripción regula la expresión génica. Además, se empleó DAPI para marcaje del núcleo y *Phalloidin* para la estructura del citoesqueleto (Figura 5).

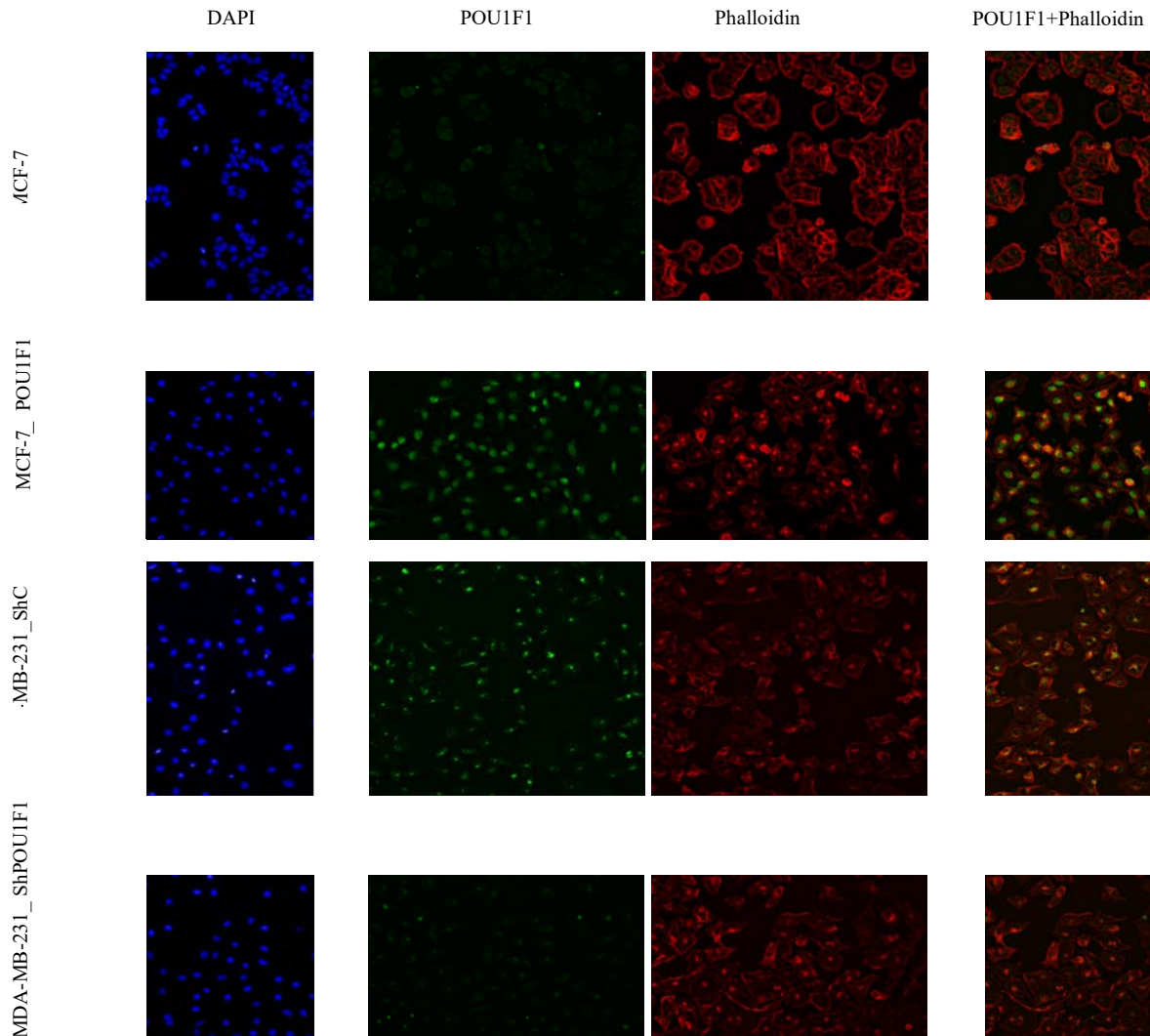


Figura 5. Imágenes representativas de POU1F1 después de su sobreexpresión estable en células MCF-7 y tras su bloqueo en células MDA-MB-231. Se utilizaron los anticuerpos descritos en la Tabla 2. DAPI-DNA, Phalloidin-Citoesqueleto, POU1F1-ALEXA488.

7.2. POU1F1 EN CÉLULAS MCF-7 PROMUEVE ENRIQUECIMIENTO DE GENES RELACIONADOS CON CSCs

Para evaluar el efecto de POU1F1 en la transformación o adquisición de un fenotipo asociado a las células troncales cancerígenas (BCSC), se realizó un análisis de secuenciación de ARNm (RNAseq) en la línea celular MCF-7 con sobreexpresión de POU1F1. Los resultados mostraron que POU1F1 induce un enriquecimiento en diversas firmas génicas, incluyendo genes característicos de células troncales mamarias normales (LIM_MAMMARY_STEM_CELL_UP) y genes regulados en CSC/BCSC (ZHANG_BREAST_CANCER_PROGENITORS_UP) (Figura 6A). Además, se observó un enriquecimiento en genes relacionados con la diferenciación y proliferación de células troncales, y la activación de *hallmarks* relacionados con la EMT y con vías de señalizaciónamente vinculadas a las BCSC (Figura 6B).

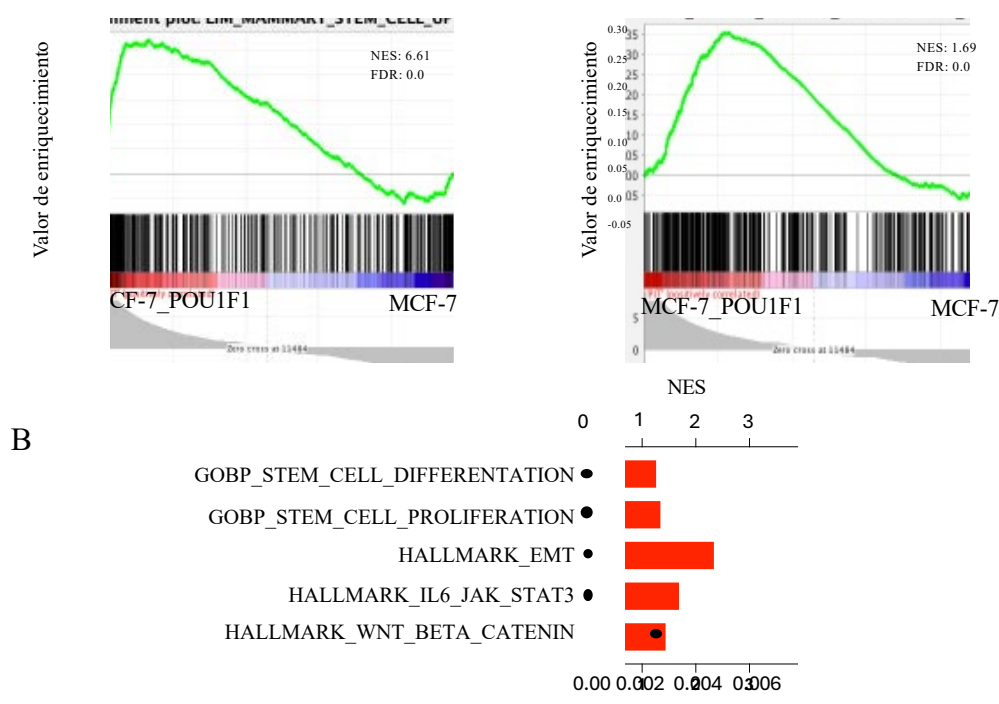


Figura 6. (A-B). Análisis de enriquecimiento de genes (GSEA) en células MCF-7 con sobreexpresión estable de POU1F1.

7.3. POU1F1 REGULA EN CÉLULAS TUMORALES GENES IMPLICADOS EN BCSC

Siguiendo los criterios establecidos para el análisis de RNAseq, se identificaron un total de 9591 genes desregulados, es decir que tenían un $FDR < 0.05$ respecto al control. Considerando solo los genes que tenían veces de cambio mayor que 2.5 se identificaron 2663 genes regulados a la baja (*downregulated*) y 2043 genes regulados al alza (*upregulated*). Los resultados revelaron una regulación significativa de múltiples genes clave en los procesos de diferenciación y proliferación de CSC/BCSC. La sobreexpresión de POU1F1 en células MCF-7 aumenta la expresión de genes como *CD44*, *ITGA6 (CD49f)*, *EGFR*, *NTE5* y disminuye la expresión de *CD24*, *EpCAM*, *FOXA1*, *NOTCH3* (Figura 7A). Para determinar si esta regulación también se observa en células normales, se llevó a cabo un análisis de RNAseq en células epiteliales mamarias humanas normales (*Human Mammary Epithelial Cells*, HMEC) con/sin sobreexpresión de POU1F1 (Figura 7B). La comparación de ambos estudios muestra que la regulación de los marcadores asociados a BCSC es exclusiva de las células tumorales, sugiriendo que POU1F1 puede desempeñar un papel específico en la transformación de células tumorales a BCSCs.

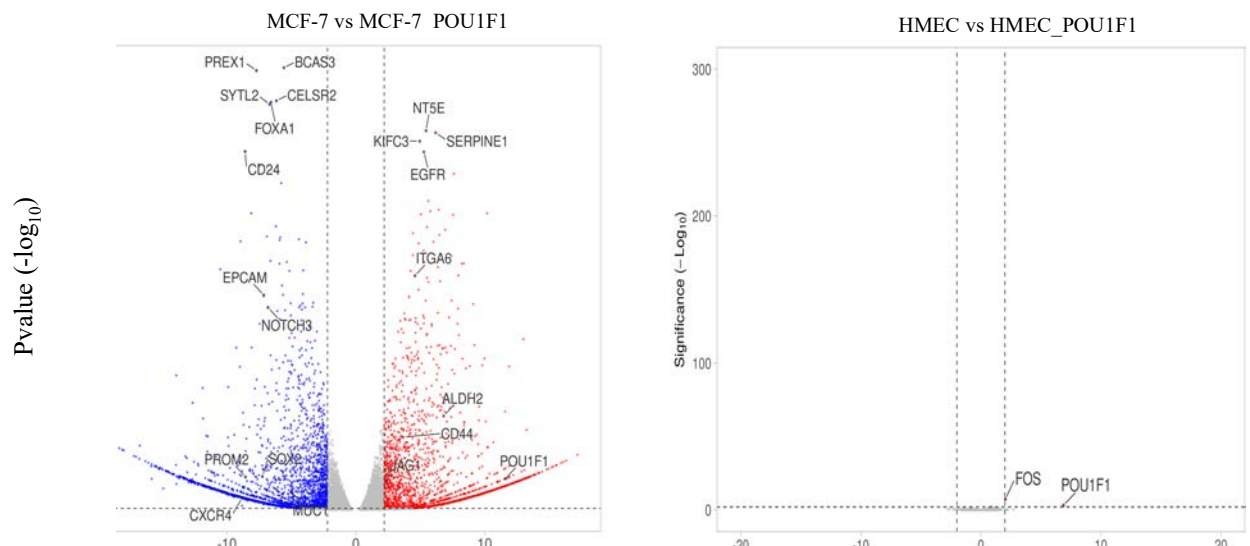


Figura 7. (A-B). Volcano Plot de estudio RNA-seq en células MCF-7 y HMEC con sobreexpresión de POU1F1. Se tomaron como criterio de genes regulados los que tenían una tasa de cambio relativa (*Fold Change*) > 2.5 y < -2.5 .

7.4. POU1F1 INDUCE FENOTIPO BCSC EN CÉLULAS MCF-7 CON CAMBIOS EN CD24, CD44, CD133 Y ALDH

Los datos de RNA_seq indican modificaciones en la expresión de *CD24* y *CD44*, por lo que se diseñaron oligonucleótidos de amplificación específicos para verificar estos resultados mediante qPCR. Además, se evaluaron los niveles de ARNm de otros dos marcadores característicos de BCSC, *CD133* y *ALDH1A1* (la forma mayoritaria/principal de ALDH). Las células que sobreexpresan POU1F1 muestran un aumento significativo en la expresión de *CD44*, *CD133* y *ALDH1A1* ($p < 0.0001$), junto con una disminución en la expresión de *CD24* ($p < 0.0001$), en relación con las células MCF-7 (Figura 8).

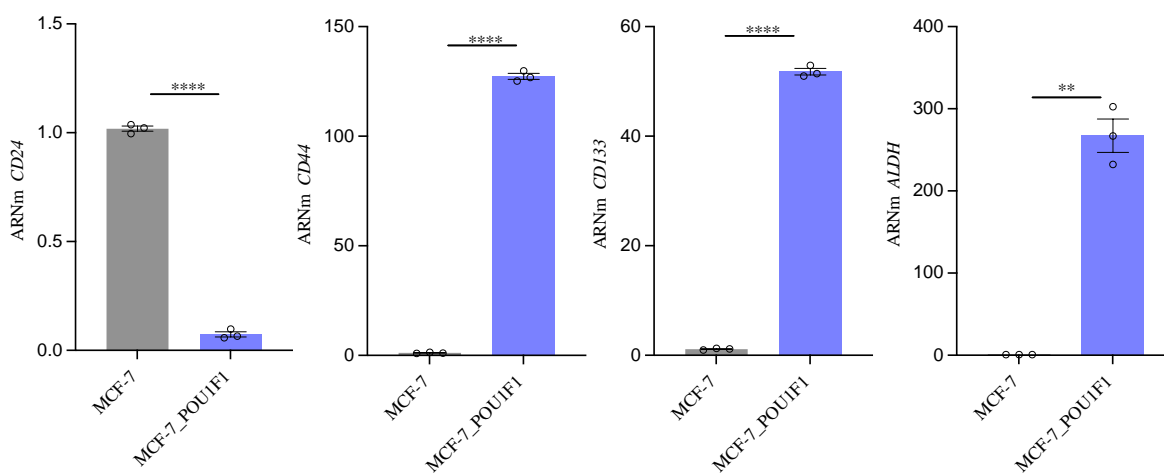


Figura 8. Niveles de expresión relativa ARNm de *CD24*, *CD44*, *CD133* y *ALDH* en células MCF-7 y MCF-7-POU1F1 normalizados a partir del gen *18S*. Los valores se representan como la media \pm EEM. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba t-Student con una significación de, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ con respecto al control.

Para confirmar si POU1F1 podía inducir un fenotipo de BCSC, se realizó también un análisis de expresión proteica por citometría de flujo. Los resultados revelaron que las células MCF-7, que inicialmente presentaban un fenotipo $CD24^{+}/high/CD44^{-}/low$ (71.1%), cambiaron a un fenotipo $CD24^{-}/low/CD44^{+}/high$ (98.4%), además cerca de 5% de la población mostró un aumento en la expresión del marcador de superficie CD133. Dado los bajos niveles de expresión proteica de ALDH o sus isoformas, la valoración de este marcador se realiza habitualmente analizando la actividad enzimática de esta proteína mediante un ensayo ALDEFLUOR. Los resultados obtenidos demuestran que tras sobreexpresión de POU1F1 se produce un significativo incremento de la actividad de ALDH, cerca de un 18% de la población celular adquiere un aumento en la actividad de esta enzima (Figura 9).

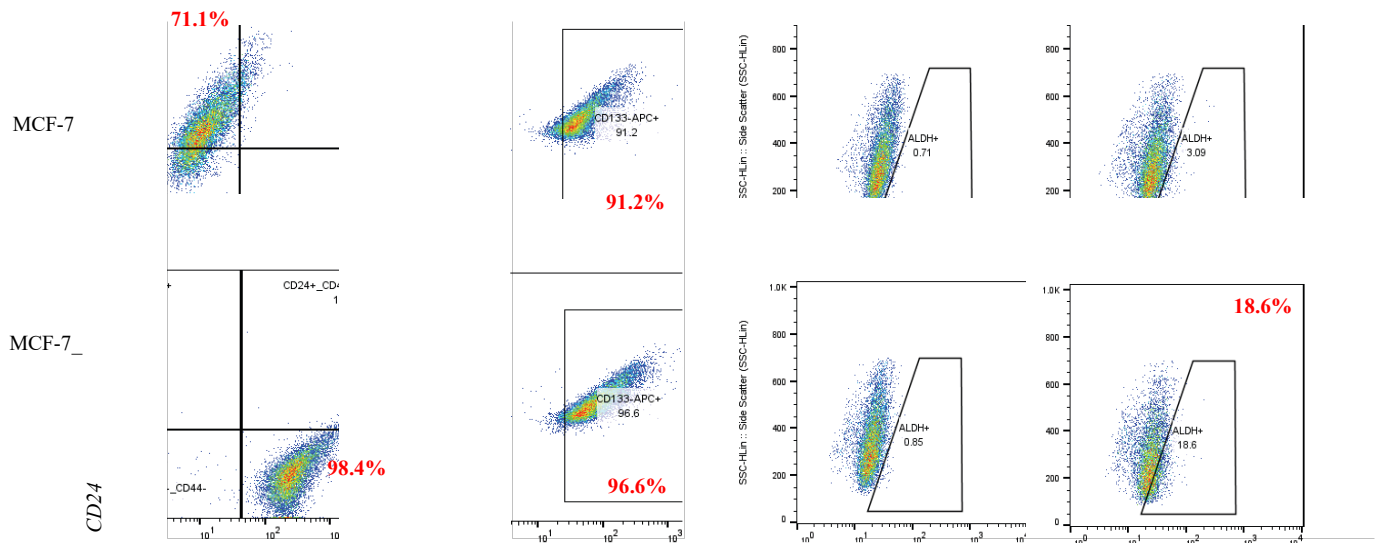


Figura 9. Análisis por citometría de flujo de CD44 (FITC)/CD24 (PE) (doble marcaje), CD133 (APC), y actividad ALDH (488nm) en las líneas celulares MCF-7 y MCF-7-POU1F1.

7.5. EL BLOQUEO DE POU1F1 REDUCE LOS NIVELES ARNm DE MARCADORES BSCS Y LA ACTIVIDAD ALDH

El efecto del silenciamiento de POU1F1 se realizó en células MDA-MB-231. Los resultados de ARNm muestran un aumento del marcador *CD24* ($p < 0.05$) y una disminución de *CD44*, *CD133* y *ALDH* ($p < 0.001$) (Figura 10), al contrario de los efectos observados con la sobreexpresión de POU1F1 en las células MCF-7. Además, la citometría de flujo revela una disminución del fenotipo *CD44^{+/high}* (84.5%) en relación con las células MDA-MB-231 control (89.7%) y disminución de *CD133*. La actividad ALDH de estas células disminuye de forma drástica (un 95%) lo que podría indicar que este marcador está regulado de forma directa o indirecta por la expresión POU1F1 (Figura 11).

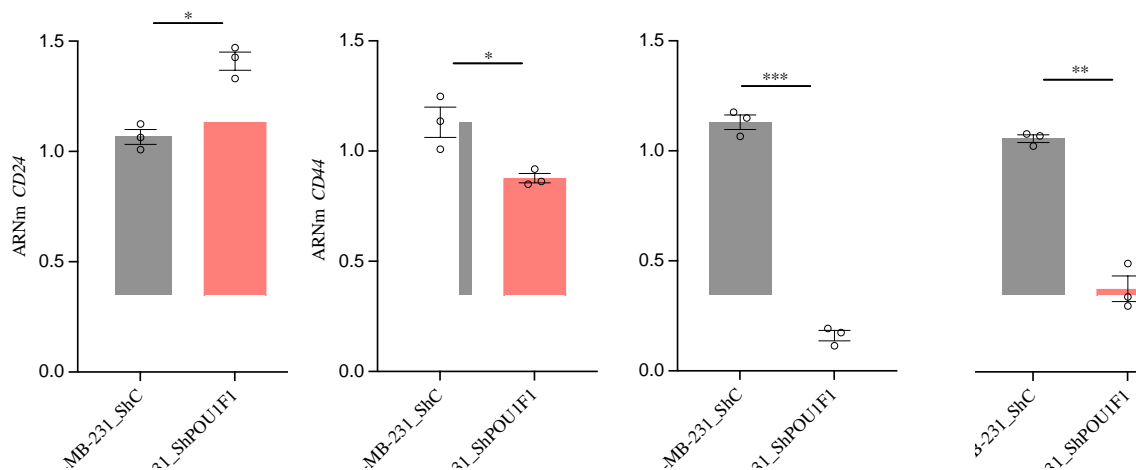


Figura 10. Niveles de expresión relativa de ARNm de *CD24*, *CD44*, *CD133* y *ALDH* en células control (MDA-MB-231-ShC) y con silenciamiento de POU1F1 (MDA-MB-321-ShPOU1F1) normalizados a partir del gen 18S. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba t-Student con una significación de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ con respecto al control.

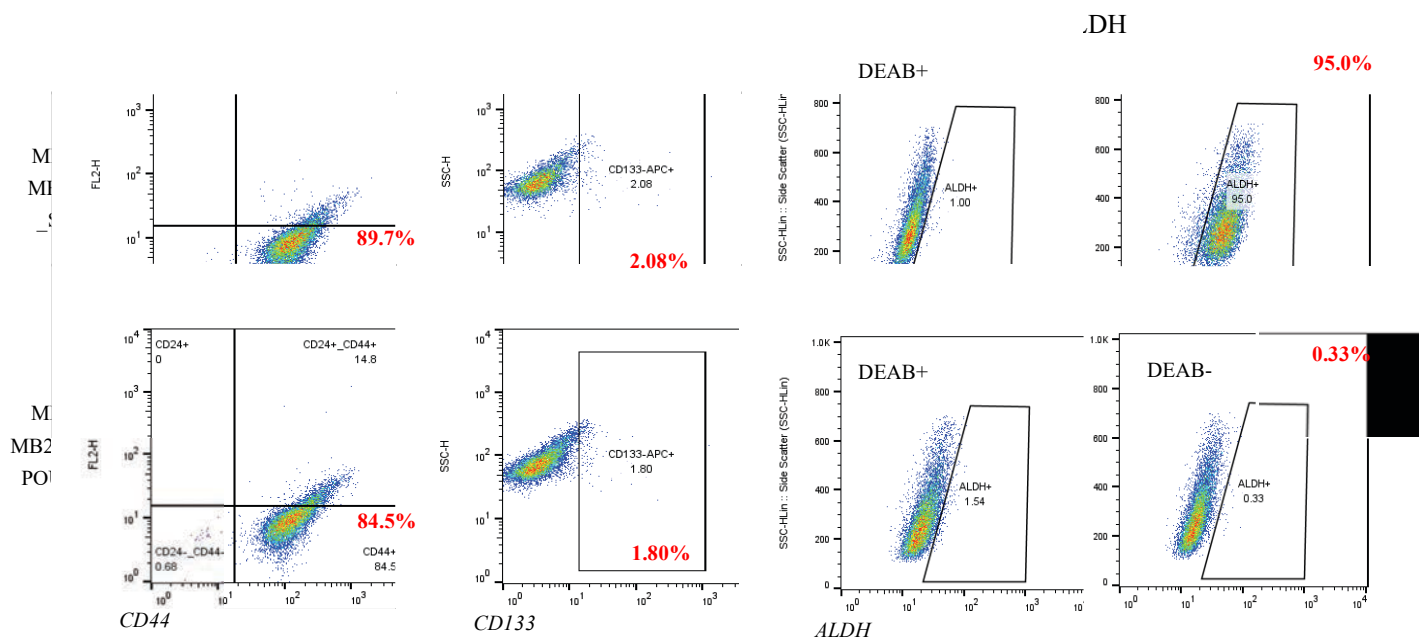


Figura 11: Análisis por citometría de flujo de CD44-FITC/CD24-PE (doble marcaje), CD133-APC, y ALDH-488 (actividad ALDH) en las líneas celulares MDA-MB-321 y MDA-MB-321-ShPOU1F1.

7.6. CORRELACIÓN ENTRE POU1F1 Y MARCADORES BCSC EN TUMORES DE MAMA

Un análisis bioinformático de bases de datos de tumores de cáncer de mama humano reveló una correlación significativa entre la expresión del factor de transcripción *POU1F1* y los marcadores asociados con BCSC. Para este estudio se empleó la base de datos GSE65194 (n=130) que contiene muestras de los diferentes subtipos clínicos de tumores, Luminal A, Luminal B, HER+ y TNBC. Se seleccionaron los tumores con alta expresión de marcadores BCSC (*CD44*, *CD133* y *ALDH1A1*) y en el caso de *CD24* los tumores con menor expresión de este marcador, definidos como aquellos con niveles de expresión de ARNm superior o inferior a la media. Estos valores, se correlacionaron con los de ARNm de *POU1F1*. Los resultados mostraron una relación significativa entre *CD44*, *CD133* y *ALDH1A1* con *POU1F1* ($p=0.002$, $p=0.04$, y $p=0.03$, respectivamente), es decir, que los tumores con expresión elevada de marcadores BCSCs tiene también elevada expresión de *POU1F1* (Figura 12A-B). En el caso de *CD24* no se observa relación entre su expresión con *POU1F1*.

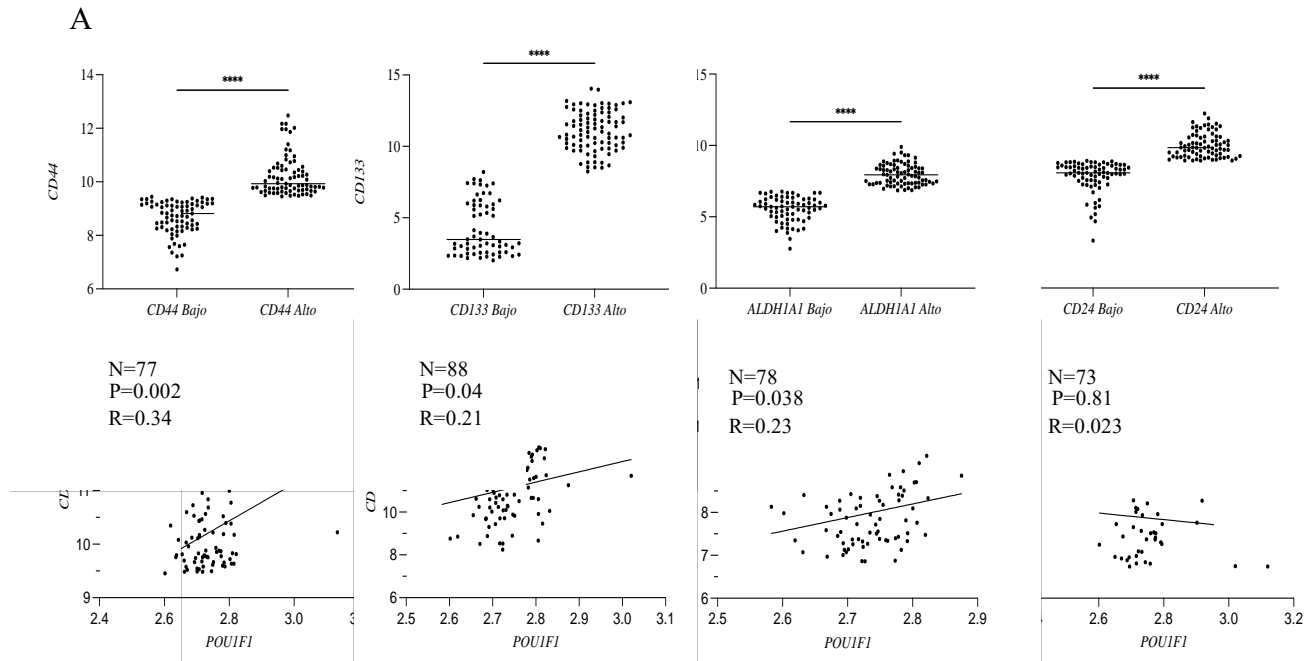


Figura 12. (A). Niveles de ARNm de *CD44*, *CD133*, *ALDH1A1* y *CD24* (alto: superior al percentil 50, bajo:inferior al percentil 50). **(B).** Análisis de correlación de Spearman entre los tumores con elevada expresión de *CD44*, *ALDH* y *CD133* y baja expresión de *CD24* y expresión de *POU1F1*.

7.7. AISLAMIENTO DE UNA SUBPOBLACIÓN ALDH^{high} A PARTIR DE CÉLULAS MCF-7_POU1F1

Dado que ALDH es uno de los marcadores de BCSC más consolidado y utilizado, se realizó el aislamiento de estas células a partir de la población celular MCF-7-POU1F1 mediante citometría de flujo -separación celular (*cell sorter*). Las células que ya tenían adquirido un fenotipo CD24⁻/CD44⁺ (98.4%) fueron separadas en función del marcador ALDH por un ensayo ALDEFLUOR, una técnica que permite medir la actividad enzimática de ALDH en células vivas. Con este ensayo, se lograron marcar y separar células MCF-7-POU1F1 con alta y baja actividad de ALDH (Figura 13A-B).

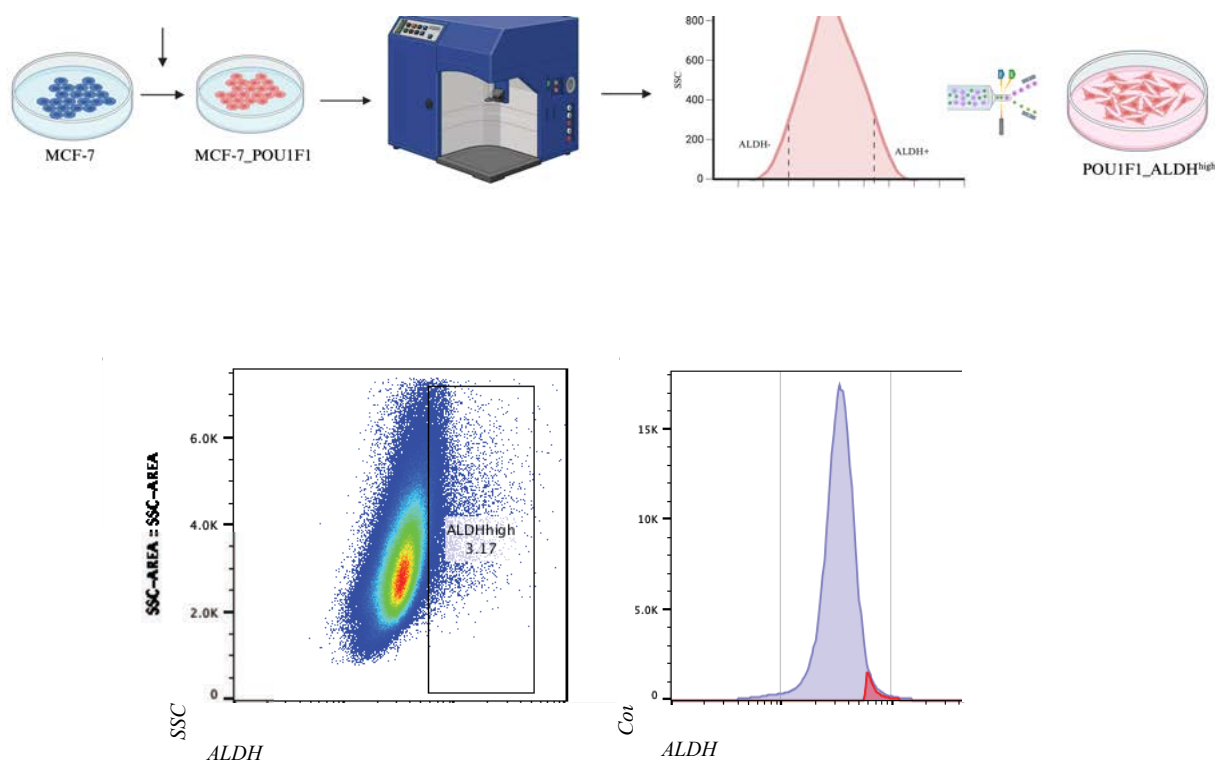


Figura 13. (A) Esquema representativo del proceso de aislamiento de células ALDH^{high} a partir de células MCF-7-POU1F1. (B) Plots del aislamiento, donde se separaron las células con mayor y menor actividad de ALDH. Imagen creada con Biorender.

Las células aisladas por citometría de flujo en base a niveles elevados de ALDH (POU1F1-ALDH^{high}) presentan en cultivo características fenotípicas diferentes a la población total (MCF-7-POU1F1), con una mayor tasa de proliferación celular. Para comprobar el correcto aislamiento de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} se realizó por qPCR un análisis de ARNm y de expresión proteica por citometría de flujo. En la Figura 14A se observan diferencias significativas ($p < 0.001$) en la expresión de ARNm de ALDH entre las células MCF-7-POU1F1 (a partir de ahora llamadas “POU1F1”) con relación a las de actividad ALDH elevada (POU1F1-ALDH^{high}). Además, por citometría de flujo se observa un enriquecimiento significativo de la actividad ALDH entre la población POU1F1y la subpoblación aislada POU1F1-ALDH^{high} (41.1% (Figura 14B).

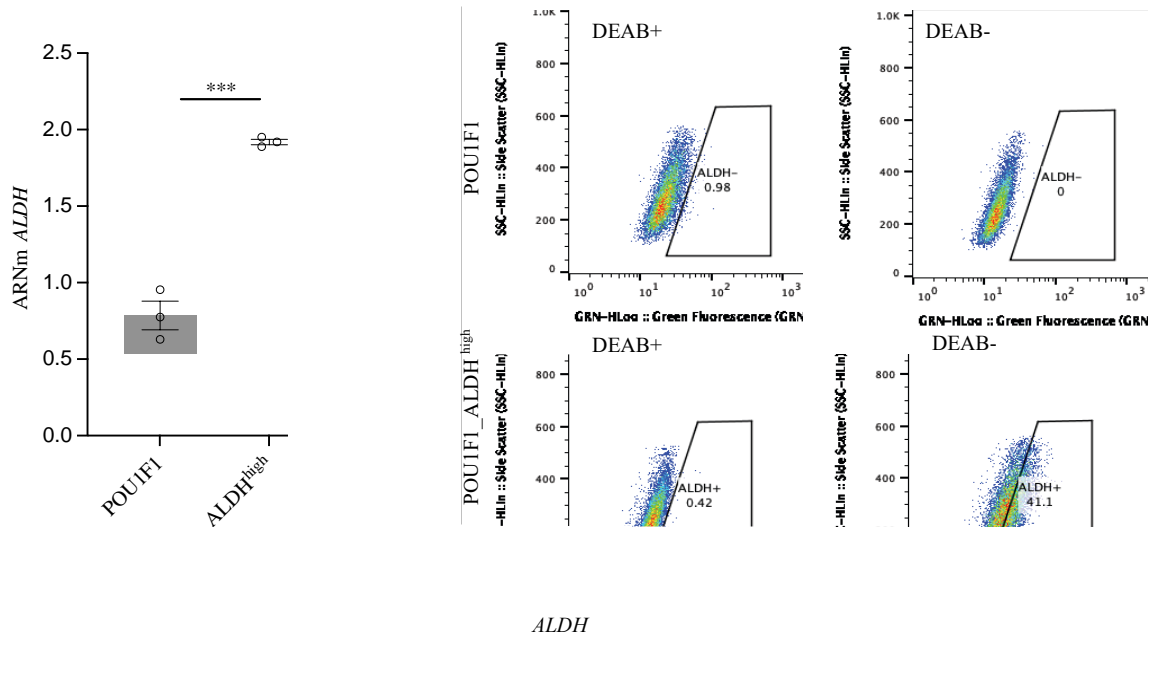


Figura 14. (A). Niveles de expresión relativa de ARNm de *ALDH* en las subpoblaciones POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high}. Los niveles de ARNm fueron normalizados a partir del gen *18S* (B). Actividad de ALDH en las subpoblaciones aisladas mediante citometría de flujo. Los valores se representan como la media \pm EEM. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba t-Student con una significación de *** $P < 0.001$ y con respecto al control.

7.8. MIGRACIÓN EN CÉLULAS CON SOBREENPRESIÓN DE POU1F1 Y ALDH^{high}

Para analizar cambios funcionales en la subpoblación aislada POU1F1-ALDH^{high}, se realizó un ensayo de cicatrización de herida (*wound healing*) para evaluar la capacidad migratoria celular. Los ensayos demostraron que la población POU1F1-ALDH^{high} presenta una mayor velocidad de migración en un periodo de tiempo de 7 h en comparación con las células MCF-7 control y con las de sobreexpresión de POU1F1 (células POU1F1) (Figura 15A-B).

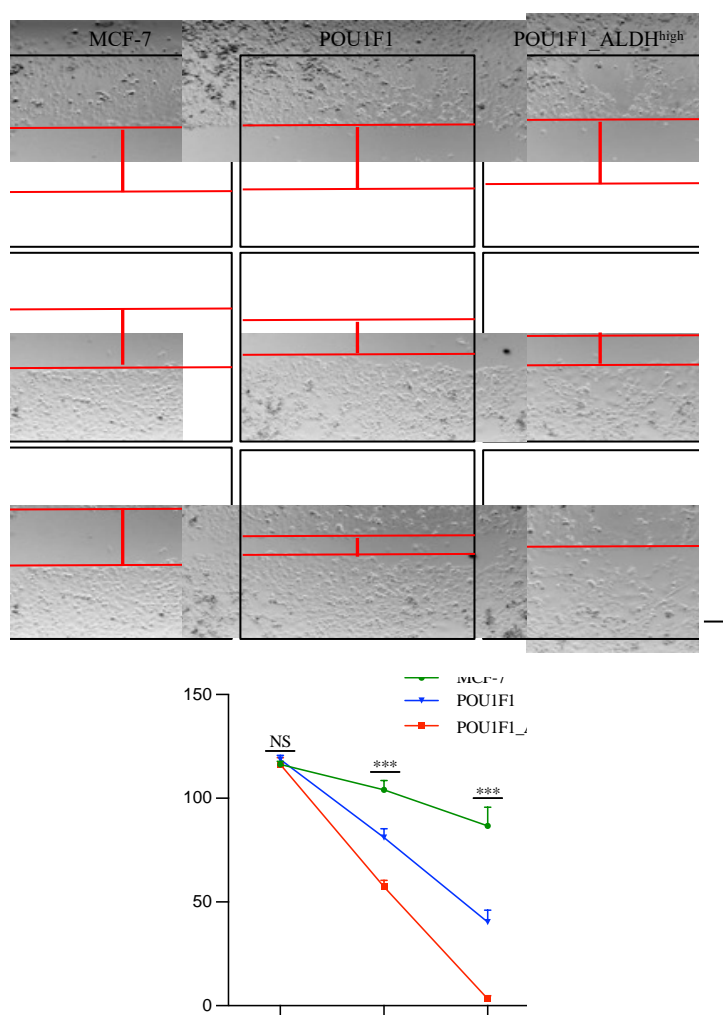


Figura 15. (A). Figura representativa del ensayo de cicatrización de heridas de células de control (MCF-7), células con sobreexpresión de POU1F1 (POU1F1) y la subpoblación POU1F1-ALDH^{high}. La distancia entre los bordes de la herida se midió a 0, 4 y 7 h. (Barra de escala: 100 μm). **(B)** Análisis cuantitativos de las medidas de tres experimentos. Las medias fueron comparadas mediante un ANOVA y los datos se representan con una significación de ***P<0.001 y NS: no significativo.

7.9. INVASIÓN CELULAR EN CÉLULAS POU1F1 Y ALDH^{high}

Se evaluó el poder metastásico de las poblaciones celulares mediante un ensayo de invasión utilizando transwells recubiertos con matrigel (Figura 16A). Las células con sobreexpresión de POU1F1 y elevada actividad ALDH (POU1F1-ALDH^{high}) muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) de la capacidad de invasión con respecto a las células con sobreexpresión de POU1F1. Las células originales MCF-7 no muestran potencial de invasión a 24 h (Figura 16B-C).

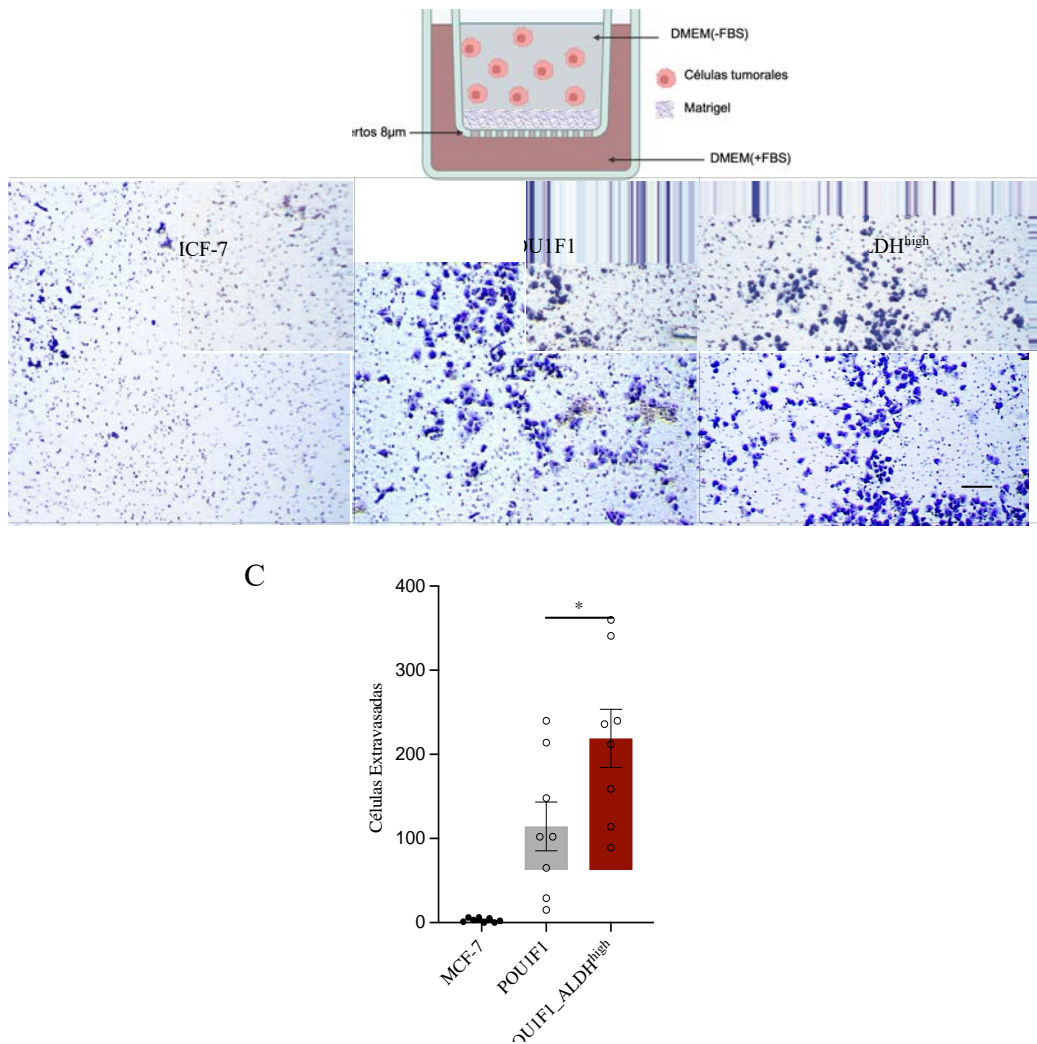


Figura 16. (A) Esquema del experimento de invasión celular, imagen creada con Biorrender (B). Figura representativa del ensayo de invasión celular (Barra de escala: 100 µm). (C). Cuantificación de tres experimentos para las células MCF-7, POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high}. Las medias fueron comparadas mediante una prueba t-student y los datos se representan con una significación de * $P < 0.05$. Los valores se representan como la media \pm EEM

7.10. LA SUBPOBLACIÓN CD44^{+/high}/CD24^{-/low} Y ALDH^{high} MUESTRA UN ELEVADO PERFIL GLUCOLÍTICO

El aumento en la capacidad de migración e invasión de las células POU1F1-ALDH^{high} observada sugiere una relación con características metabólicas distintivas. Para explorar esta posibilidad, se analizó el perfil glucolítico de estas células, dado que un metabolismo glucolítico elevado es frecuentemente asociado con la agresividad tumoral y la capacidad de adaptación a microambientes tumorales hostiles. La medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) reveló que la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} exhibe un aumento significativo de la glucólisis basal y compensatoria en comparación con las células MCF-7 y POU1F1 ($p < 0.001$ y $p < 0.05$) (Figura 17A-B). Estos resultados sugieren que el metabolismo energético elevado podría estar contribuyendo a la mayor capacidad invasiva y migratoria observada en estas células, lo que coincide con las características las BCSC.

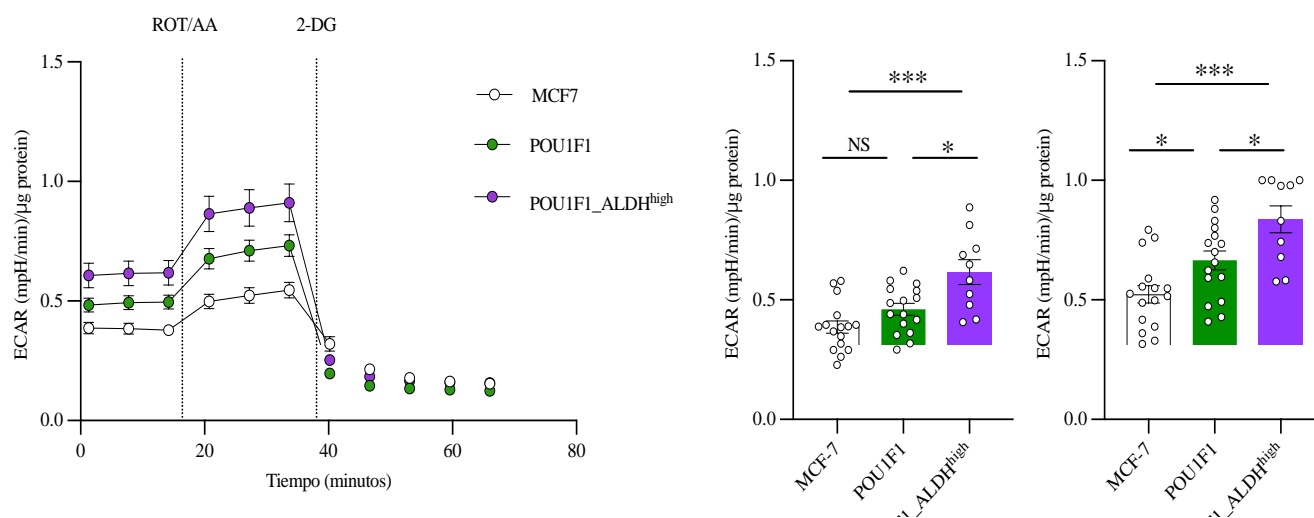


Figura 17. (A). Perfil representativo de ensayo de tasa glicolítica ECAR en células MCF7, POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high}. **(B).** Cuantificación de la glucólisis basal y glucólisis compensatoria. Las medias fueron comparadas mediante un ANOVA los datos se representan con una significación de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y ns: no significativo

7.11. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COLONIAS 2D

Una de las características de las BCSC es su capacidad de auto-renovación y proliferación. La densidad y el tamaño de las colonias formadas pueden ser utilizados como un indicador de la agresividad y potencial tumorigénico de estas células. Se evaluó la capacidad clonogénica de estas células mediante un ensayo de formación de colonias. Mientras que las células MCF-7 no lograron formar colonias, la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} demostró un significativo ($p < 0.001$) potencial clonogénico en comparación con las células POU1F1 (Figura 18A-B).

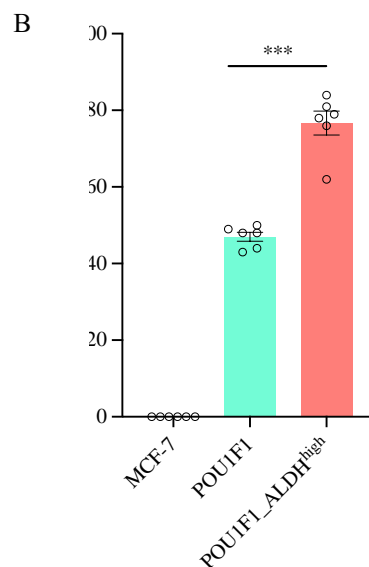
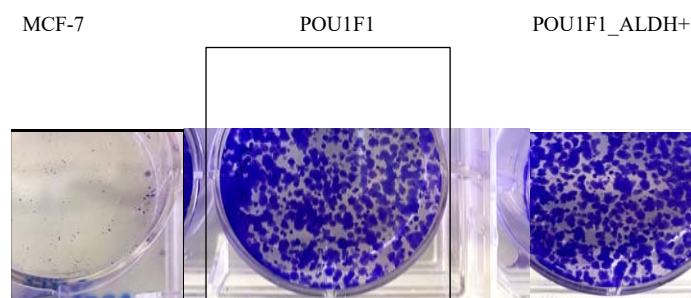


Figura 18. (A). Imagen representativa de la formación de colonias con una tinción cristal violeta. **(B)** Cuantificación de colonias en diferentes experimentos ($n=6$). Las medias fueron comparadas una prueba t-student. $***P < 0.001$. Los valores se representan como la media \pm EEM

7.12. ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE MAMOSFERAS 3D

Se evaluó también la capacidad de formación de mamíferas de estas células. La línea MCF-7 no fue capaz de generar estructuras tridimensionales. Por el contrario, tanto las células MCF-7 con sobreexpresión estable de POU1F1 (POU1F1) como la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} formaron esferas en los días 14 y 21, aunque no se observó diferencia significativa en el volumen que adquirirían estas esferas (Figura 19A-B).

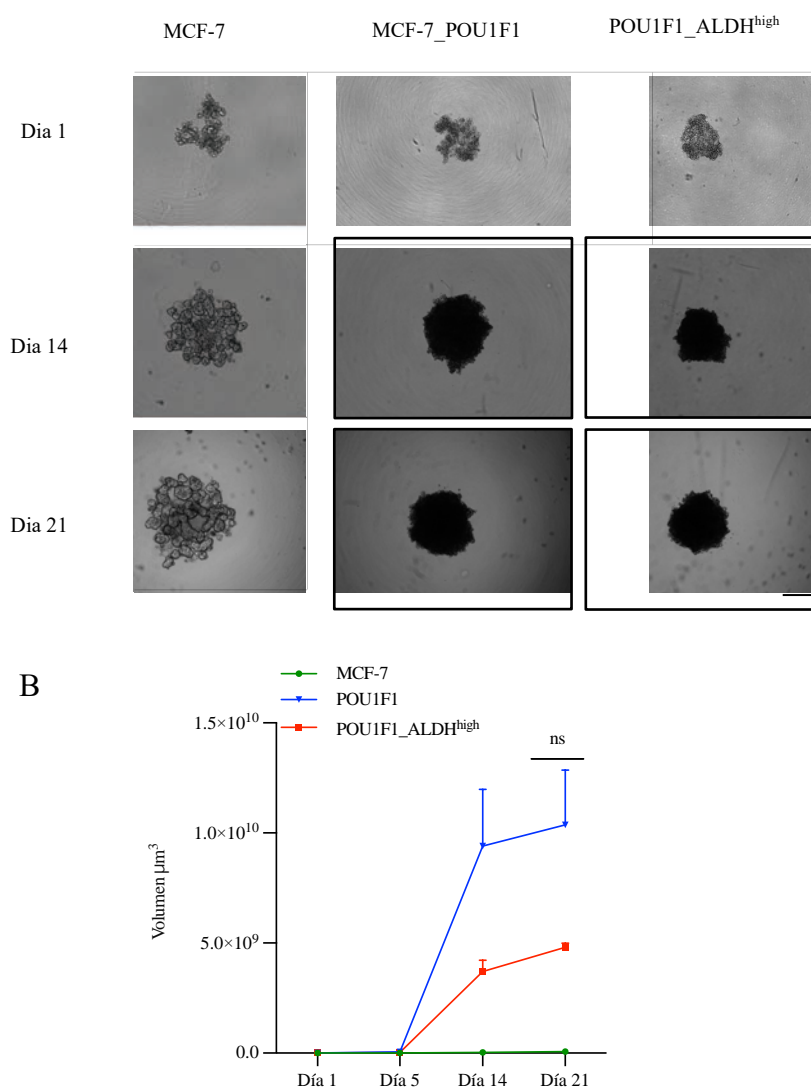


Figura 19. (A). Formación de mamíferas a los días 1, 14 y 21 (Barra de escala: 200 μm). **(B).** Comparación del volumen de las mamíferas mediante una prueba t-student, NS: no significativo. Los valores se representan como la media ± EEM.

Se utilizó microscopía confocal de barrido para evaluar el grado de compactación interna de las esferas. Aunque las mamóferas de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} presentaban un volumen similar al de sus controles, mostraron un grado de compactación significativamente mayor en comparación con las mamóferas de control POU1F1 ($P < 0.001$) (Figura 20A-B). El análisis de ARNm de estas estructuras demostró un aumento significativo ($p < 0.01$) de la expresión de marcador *CD49f* y disminución ($p < 0.001$) de *EpCAM* (Figura 20C). Estos marcadores han sido descritos como característicos de subpoblaciones de células luminales progenitoras ($CD49^+$) y células luminales maduras ($EpCAM^+$). Se ha documentado este fenotipo ($CD49^+/EpCAM^-$), asociado a un elevado potencial metastásico de las células y a elevado riesgo de recurrencia de la enfermedad.

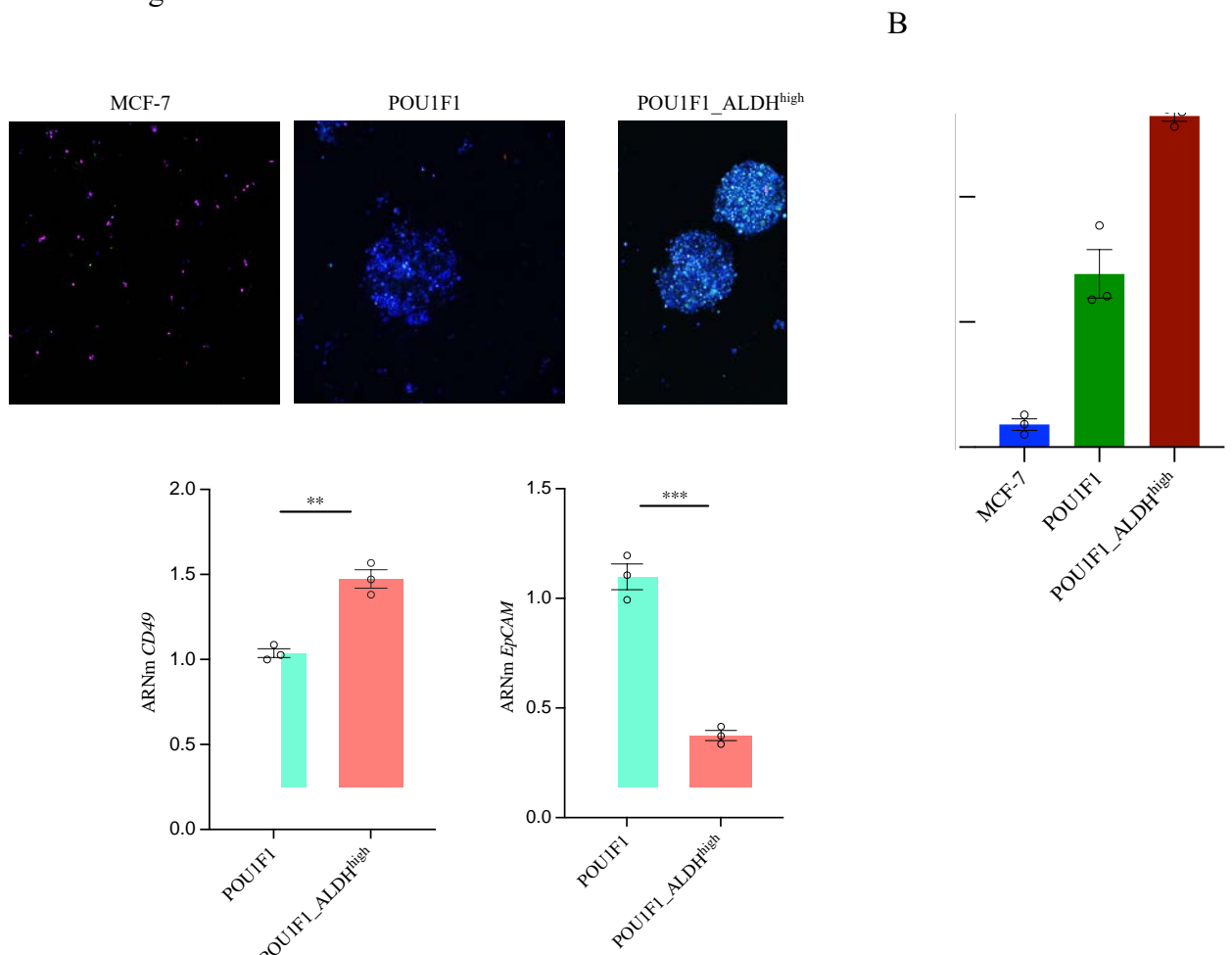


Figura 20. (A). Microscopía confocal de barrido para determinar el grado de compactación y composición de las mamóferas en su interior (triple tinción Hoechst, caspasa 3/7 y yoduro de propidio) (Barra de escala: 200 μ m). **(B).** Análisis cuantitativo de la media de fluorescencia de las mamóferas. **(C).** Niveles de expresión relativa ARNm de *CD49* y *EpCAM*. Las medias fueron comparadas utilizando una prueba t con una significación de $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. Los valores se representan como la media \pm EEM.

7.13. LA SUBPOBLACIÓN ALDH^{high} MUESTRA MAYOR RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL Y A LA RADIACIÓN

Para evaluar la posible mayor resistencia de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} a tratamientos convencionales de quimioterapia y radiación, se realizaron pruebas tanto de manera independiente como combinando ambas terapias (Figura 21A). Como quimioterapia se utilizó el tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos y tratamiento estándar para tumores tipo Luminal A (fenotipo de las células MCF-7). Tanto la radioterapia y la quimioterapia administradas de forma individual ($P < 0.001$ y $p < 0.0001$), como en combinación ($P < 0.001$ y $p < 0.0001$), demostraron que las células POU1F1-ALDH^{high} tenían una mayor resistencia en comparación con las células MCF-7 y POU1F1 (Figura 21B).

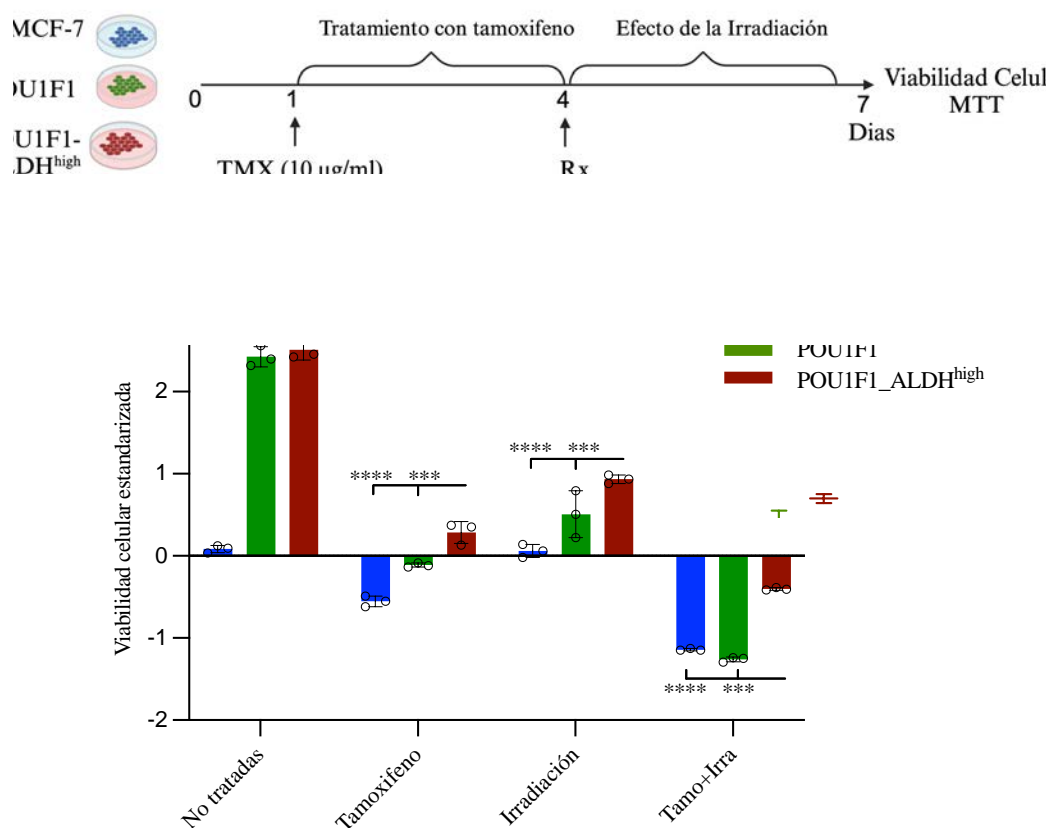


Figura 21. (A). Esquema de tratamiento combinado de quimioterapia y radiación. (B). Viabilidad celular (MTT) en las células después de los diferentes tratamientos individuales y combinados. Las medias fueron comparadas utilizando un ANOVA con una significación de $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. Los valores se representan como la media \pm EEM

7.14. LA SUBPOBLACIÓN ALDH^{high} TIENE MAYOR POTENCIAL DE INICIACIÓN DE TUMORES EN RATONES INMUNODEFICIENTES

Para corroborar los efectos observados *in vitro* y con el fin de evaluar el potencial iniciador de tumores de las diferentes subpoblaciones celulares, se implementó un modelo de xenoinjerto en ratones hembra inmunodeprimidos de la cepa NRj-Foxn1^{nu/un} de 8 semanas de edad. Se utilizaron las líneas celulares MCF-7, POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high}. Los ratones fueron inyectados de forma subcutánea en la cuarta glándula mamaria. Para estudiar el potencial iniciador de tumores de estas células, se utilizaron dos subgrupos a los cuales se les inyectaron cantidades diferentes de células: 5×10^2 y 5×10^3 respectivamente. El seguimiento del crecimiento tumoral se realizó durante 8 semanas, evaluando la aparición y tamaño de tumores (Figura 22).

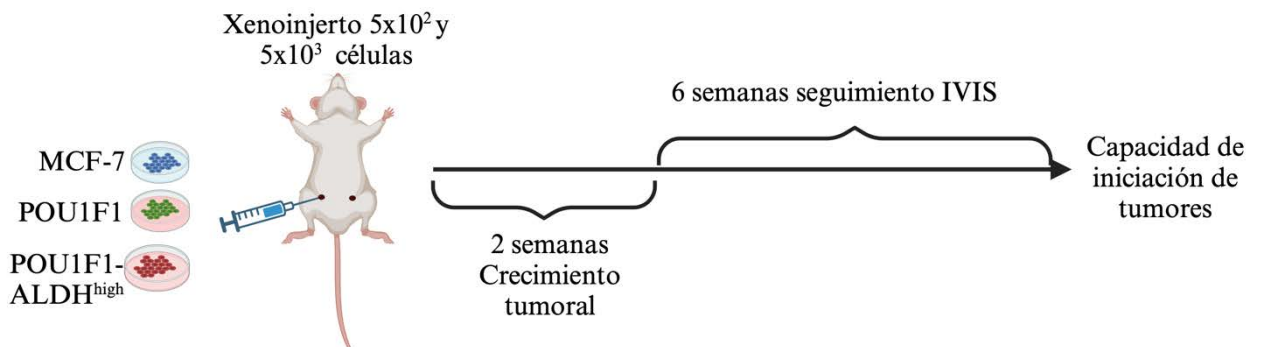
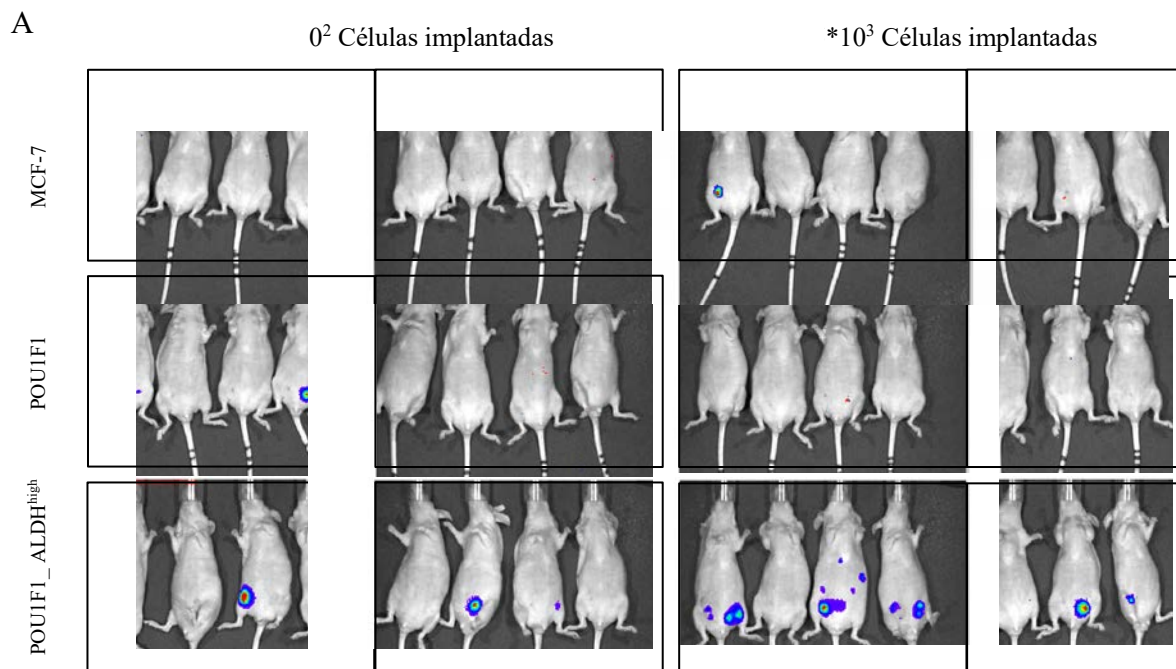


Figura 22. Esquema de implantación de tumores en ratones

Los resultados obtenidos indicaron que el grupo POU1F1-ALDH^{high} presentó una frecuencia de formación de tumores (1/2769) mayor en comparación con los otros grupos POU1F1 (1/19249) y MCF-7 (1/36443) (Figura 23A-C). La comparación entre la población POU1F1-ALDH^{high} mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) en la cantidad de tumores formados con el respecto a los otros dos grupos. Estos datos sugieren el papel crítico de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} en la iniciación tumoral, siendo esta una característica distintiva de las BCSC que hacen posible la aparición de metástasis a distancia.



Grupos	5*10 ² células	5*10 ³ células	Frecuencia de iniciación de tumor
MCF- 7	0/8	1/7	1/36443
POU1F1	2/8	0/7	1/19249
POU1F1_ALDH ^{high}	3/8	5/7	1/2769

Grupo Vs Grupo	Chisq	Pvalue(>Chisq)
MCF-7 Vs. POU1F1	0.287	0.592
MCF- 7 Vs. POU1F1_ALDH ^{high}	9.79	0.00176
POU1F1 Vs. POU1F1_ALDH ^{high}	7.55	0.006

Figura 23. (A). Seguimiento de las células tumorales implantadas para cada grupo de ratones. Imágenes tomadas en la semana 6. **(B).** Cálculo de la frecuencia de iniciación de tumor con las diferentes líneas celulares empleadas. Para el cálculo se utilizó el programa ELDA (<https://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>). **(C).** Análisis comparativo de iniciación tumoral utilizando la prueba Chi-Square entre los diferentes grupos.

7.15. POU1F1 ACTIVA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN IL-6/JAK/STAT3

Durante el análisis de los datos del RNA-seq, encontramos que la sobreexpresión de POU1F1 indujo un claro enriquecimiento de las vías de señalización relacionadas con respuesta inflamatoria. Específicamente encontramos un enriquecimiento significativo del conjunto de genes correspondientes a la vía de señalización IL-6/JAK/STAT3 (Figura 24A). Esta vía ha sido descrita ampliamente por su implicación en la regulación de características CSC (Figura 24B) en diferentes tipos tumores. También encontramos que POU1F1 regula un grupo de interleuquinas relacionadas con procesos inflamatorios entre la que se encuentra IL-6, la cual es la principal molécula que activa esta vía de señalización (Figura 24C).

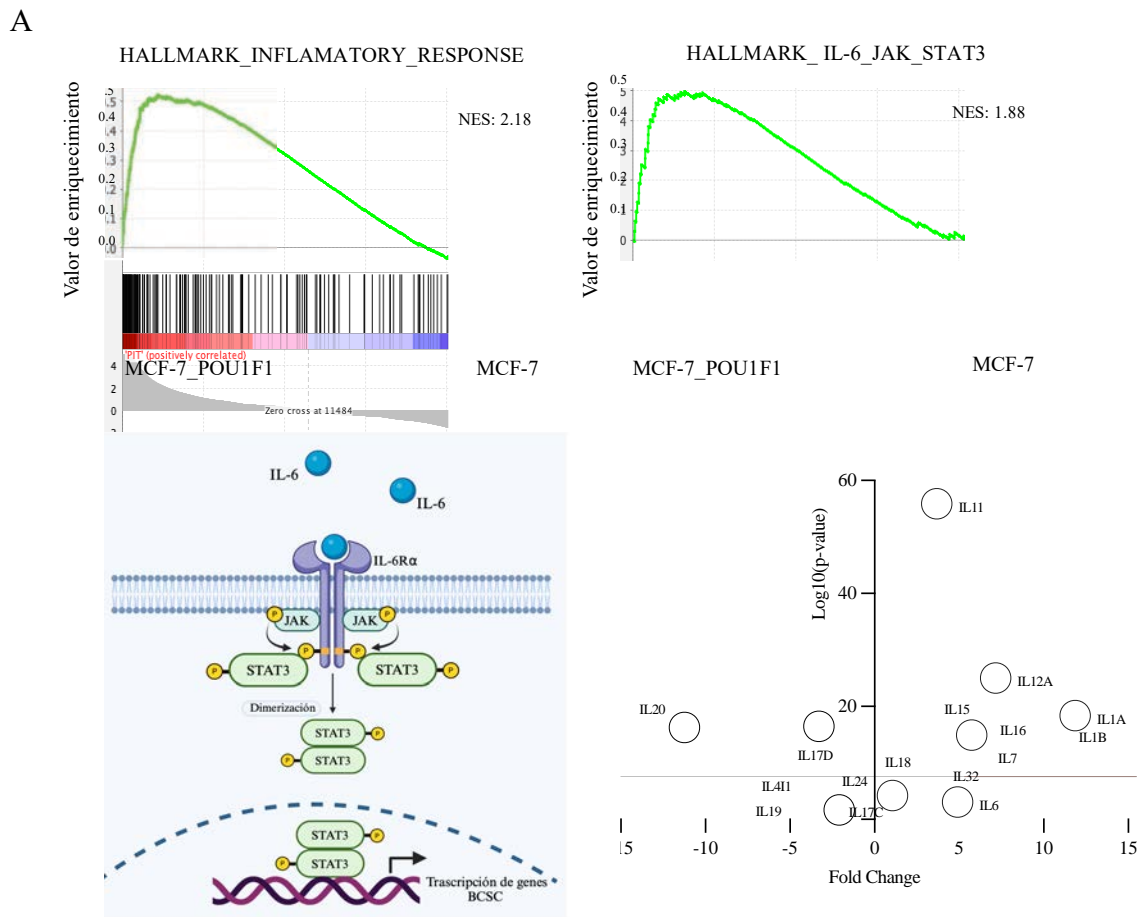


Figura 24. (A). Análisis de enriquecimiento de genes (GSEA) en células MCF-7 con sobreexpresión estable de POU1F1. (B). Esquema representativo de la vía de señalización generado en Biorender (C). Interleuquinas reguladas por la sobreexpresión de POU1F1.

7.16. POU1F1 INDUCE EXPRESIÓN DE IL-6 Y PROMUEVE LA ACTIVACIÓN STAT3

Lo siguiente fue comprobar mediante qPCR la expresión a nivel transcripcional de la *IL-6* en las células POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high} respecto a su control ($p < 0.0001$) (Figura 25A). Además, mediante un ensayo ELISA se midió la IL-6 libre en sobrenadante (Figura 25B) lo que podría ser indicativo de una posible regulación autocrina y paracrina de esta interleucina en el entorno celular. Los datos mostraron un aumento de la IL-6 libre en el sobrenadante POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high} respecto al control ($p < 0.0001$).

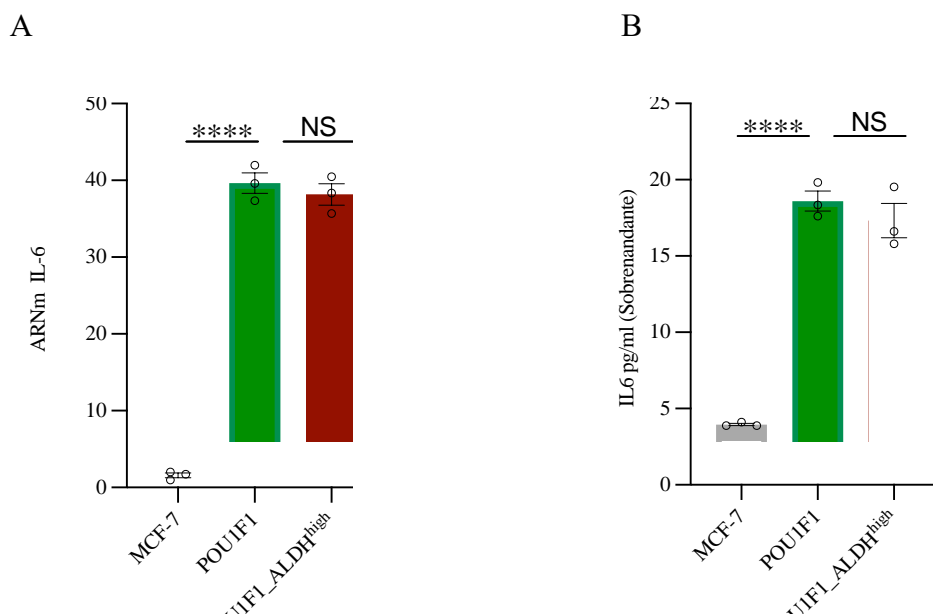


Figura 25. (A). Niveles de expresión relativa de ARNm de *IL-6* en células MCF-7, POU1F1 y POU1F1-ALDH^{high} **(B).** Ensayo ELISA de los niveles de IL-6 libre en medio. Los valores se representan como la media \pm EEM y las medias fueron comparadas utilizando una prueba t y se representa con una significación de **** $P < 0.0001$.

No se detectaron diferencias en los niveles de IL-6, ni a nivel transcripcional ni en la cantidad de IL-6 libre en el medio, entre las células del grupo POU1F1 y su subpoblación POU1F1-ALDH^{high} por lo que se decidió evaluar solo la activación de la fosforilación en la línea de POU1F1. La figura 26 muestra los niveles elevados de p-STAT3 en las células con sobreexpresión de POU1F1 detectados mediante Western blot, sugiriendo que POU1F1 regula indirectamente la activación de STAT3 a través de la inducción de IL-6. Además, observamos que la sobreexpresión de POU1F1 no solo activó STAT3, sino también las vías de señalización

de AKT y ERK1/2. Estas vías, reguladas downstream de IL-6 y p-STAT3, son cruciales para procesos como la diferenciación y la proliferación celular.

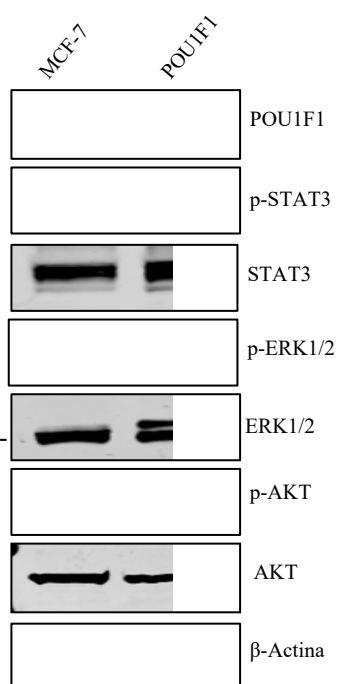


Figura 26 . Western blot de POU1F1, p-STAT3, STAT3, p-ERK1/2, ERK1/2, p-AKT, AKT, y β -actina en células MCF-7 con sobreexpresión de POU1F1.

7.17. LA EXPRESIÓN DE POU1F1 EN CÉLULAS MCF-7 IMPULSA LA SEÑALIZACIÓN IL-6/ p-STAT3 PARA REGULAR LA ACTIVIDAD ALDH

Finalmente, buscamos correlacionar el efecto de la activación de STAT3 con la expresión de marcadores de células troncales de cáncer de mama (BCSC). En células que sobreexpresan POU1F1, inhibimos la fosforilación de STAT3 utilizando inhibidores de la familia de las tirosinas y *Janus* quinasas (JAK), que regula la fosforilación de STAT3 *upstream* en la vía de señalización. Los resultados indican que ambos inhibidores, Ruxolitinib y Ag490, son capaces de disminuir la fosforilación de STAT3, siendo Ag490 el que muestra un efecto más notable (ver Figura 27).

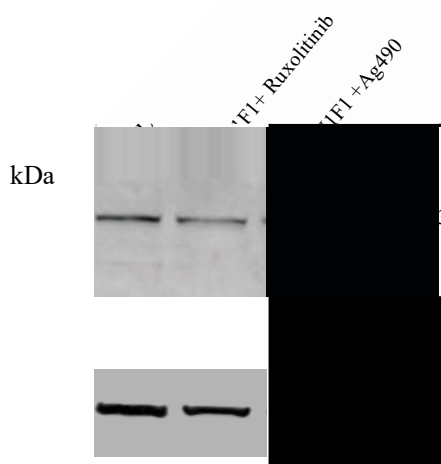


Figura 27. Western blot, p-STAT3, STAT-3 y GAPDH en células MCF-7 con sobreexpresión de POU1F1 tratadas con los inhibidores Ruxolitinib y Ag490.

El siguiente paso fue evaluar si la disminución en los niveles de fosforilación de STAT3 influía en la expresión de ALDH en células con sobreexpresión de POU1F1. El análisis de los niveles de mRNA reveló una disminución significativa en la expresión de ALDH tras el tratamiento de las células POU1F1 con los inhibidores Ruxolitinib y AG490 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, respectivamente) (Figura 28A). Además, mediante citometría de flujo, se analizó el impacto de la inhibición de la fosforilación de STAT3 sobre la actividad de ALDH. Los datos mostraron una disminución en la actividad de ALDH en las células tratadas con ambos inhibidores (Figura 28B). Estos resultados podrían indicar que la fosforilación de STAT3 juega un papel clave en la regulación de la expresión y actividad de ALDH en las células con sobreexpresión de

POU1F1, sugiriendo que la señalización de STAT3 es crucial para mantener los niveles elevados de ALDH^{high} en estas células.

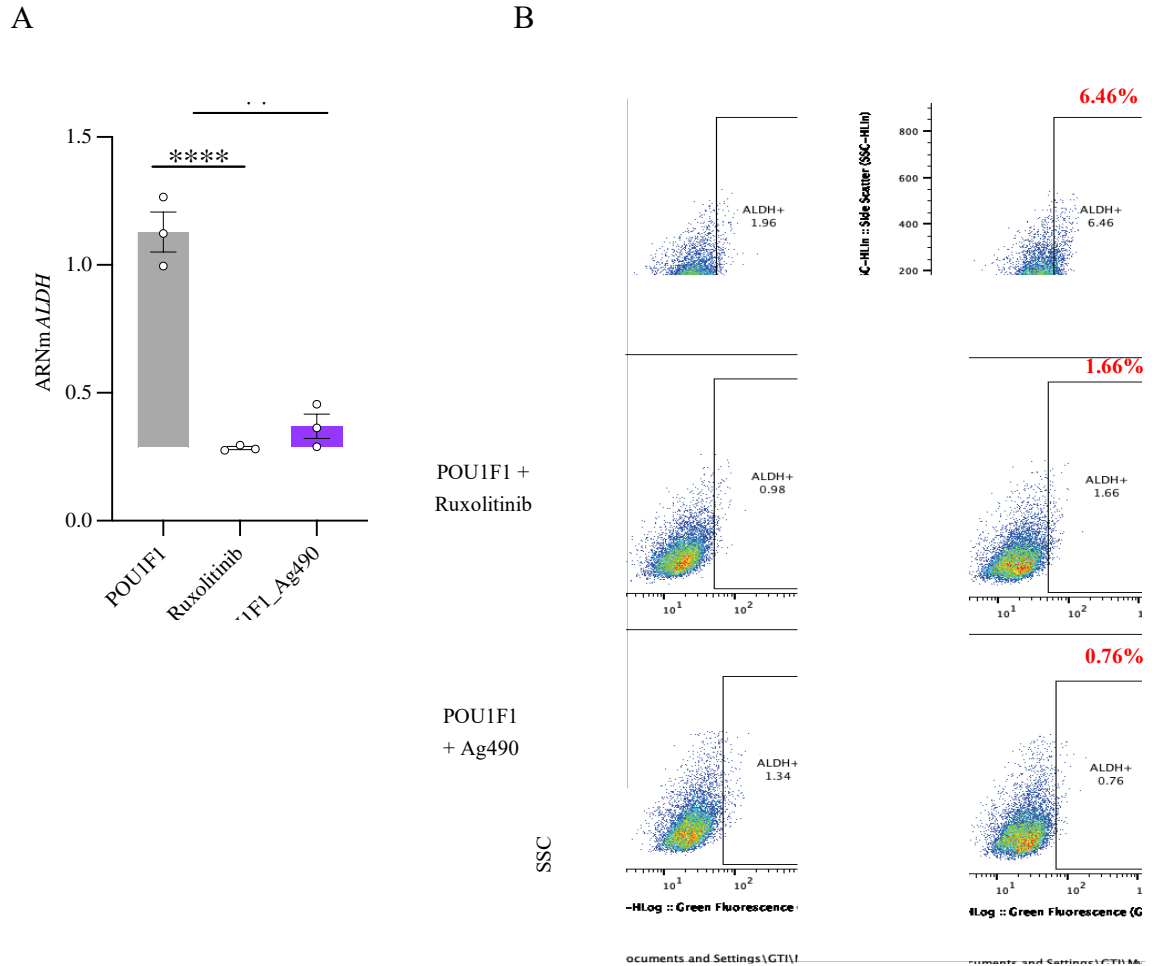


Figura 28 (A). Niveles de expresión relativa de ARNm de *ALDH* en células MFC-7 con sobreexpresión de POU1F1 tratadas con inhibidores Ruxolitinib y Ag490. **(B).** Citometría de flujo de la actividad ALDH en células MFC-7 con sobreexpresión de POU1F1 tratadas con inhibidores Ruxolitinib y Ag490. Los valores se representan como la media ± EEM y las medias fueron comparadas utilizando una prueba t y se representa con una significación de **P<0.01, ***P<0.001

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

Los avances en la investigación del cáncer de los últimos años se han enfocado en intentar comprender los diferentes componentes del cáncer más allá de las células tumorales. El microambiente tumoral (TME), que comprende múltiples tipos celulares, se ha convertido en una diana de estudio para tratar la enfermedad. Entre las causas de la complejidad para el estudio de estos componentes está la heterogeneidad de los distintos fenotipos celulares y los comportamientos intrínsecos de las células (Lin L et al., 2013).

Entre los tipos celulares del TME se encuentran las CSCs, células tumorales con capacidad de autorrenovación, diferenciación, responsables de la resistencia al tratamiento, la recaída y la metástasis del cáncer. Estas células han sido objeto de estudios y de amplios debates en cuanto a su origen. En un principio se estudió la posibilidad de que estas células podían ser el resultado de transformaciones malignas de células troncales normales, pero existe muy poca evidencia de la vinculación de tejidos no malignos y su evolución a CSC, aunque se conoce que la desregulación de muchas vías fundamentales como Wnt (Reya T et al., 2005), o NOTH (Roy M et al., 2007) afectan al mantenimiento y diferenciación de células troncales normales y pueden ser importantes en el proceso de carcinogénesis. Otros investigadores sugieren la posible reprogramación de una célula tumoral para convertirse en una CSC (Plancks V et al., 2015). En todos los casos el comprender el origen de las CSC pasa por entender cómo influyen múltiples aspectos, como el microambiente tumoral, en los mecanismos de reprogramación y en la plasticidad celular. Específicamente, en el cáncer de mama, las BCSC se han asociado directamente con pronósticos desfavorables, recurrencia de enfermedad y metástasis. La proporción de las BCSC puede variar en función de los subtipos tumorales, y la identificación de estas subpoblaciones en los diferentes tumores se ha basado en la expresión de marcadores como CD24, CD44, CD133, EpCAM, CD49f, CD90, CD61 y la actividad ALDH.

El estudio de POU1F1 por nuestro grupo y más recientemente por otros grupos (Gao Z et al., 2016 y Tang C et al., 2023) ha demostrado su importante papel en procesos de inducción y progresión tumoral. POU1F1 en la glándula mamaria induce procesos de migración celular, invasión y metástasis, además de estar relacionado con un peor pronóstico de supervivencia (Ben-Batalla et al., 2010). Específicamente, nuestro grupo ha descrito como POU1F1 induce EMT en células tumorales, proceso estrechamente relacionado con las BCSC. Además, hemos descrito la relación de POU1F1 con otros tipos de células del TME, como la capacidad de

inducir transformación de fibroblastos normales a fibroblastos asociados a tumor (NAF-CAF) a través de la reprogramación metabólica, o el reclutamiento/transformación de macrófagos normales hacia macrófagos asociados a tumor (NM-TAM) mediado por las células tumorales con elevados niveles de POU1F1 (Martinez-Ordoñez A et al., 2021, Seoane S et al., 2019). Estos datos nos han hecho hipotetizar sobre el posible papel de POU1F1 en la aparición y regulación de CSC, específicamente de BCSC en la glándula mamaria.

En este estudio, en líneas celulares de cáncer de mama con sobreexpresión y bloqueo de POU1F1, así como en modelos *in vivo*, demostramos una regulación por POU1F1 de los marcadores de BCSC, como CD24, CD44, CD133 y ALDH. Además, identificamos y aislamos una subpoblación de células tumorales con características BCSC que tienen un fenotipo CD24^{low}/CD44^{high}/ALDH^{high} que parecen ser claves en este proceso. De hecho, demostramos que esta subpoblación tiene características funcionales compatibles con BCSCs, como migración, invasión, formación de masas y cambios en su actividad metabólica. Desarrollamos con estas células modelos *in vivo* para evaluar la capacidad de inicio tumoral, característico de BCSCs, y estudiamos *in vitro* la resistencia de estas células a tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia. Finalmente, demostramos y proponemos un mecanismo para explicar cómo se regula la plasticidad de las células tumorales por POU1F1 para transformarse en BCSC.

Nuestro primer paso fue la generación de una línea celular estable con sobreexpresión de POU1F1. Para ello, utilizamos células de tipo Luminal A, MCF-7, las cuales presentan baja expresión basal de POU1F1. A partir de aquí, decidimos realizar un análisis de transcriptómica (RNA-seq) en esta línea celular. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) reveló la regulación de diversas firmas génicas asociadas tanto con células troncales mamarias normales como tumorales. Además, se identificaron conjuntos de genes implicados en procesos biológicos claves relacionados con la proliferación y diferenciación de células troncales normales. También se identificó la regulación de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (EMT), la cual promueve características propias de CSCs en distintos tipos de tumores. Además, la EMT induce la activación de vías de señalización fundamentales para el desarrollo tumoral, incluyendo TGF- β , Wnt, Notch, NF- κ B y ERK/MAPK (Huber M et al., 2005). Curiosamente, las vías de señalización IL-6/JAK/STAT3 y Wnt/ β -catenina se muestran muy reguladas tras la sobreexpresión de POU1F1. En particular, se ha descrito que la vía IL-6/JAK/STAT3 es más activa en células CD44⁺/CD24⁻ en tumores de mama en comparación con

otros tipos de tumores (Marotta LL et al., 2011). En el caso de la vía Wnt/ β -catenina diferentes estudios han demostrado que tiene un papel fundamental en la regulación de las células troncales y la autorrenovación (Li Y et al., 2003; Liu B et al., 2004). También ha sido descrito que la señalización de ambas vías juega un papel fundamental en el mantenimiento de la actividad ALDH en las BCSC en tumores TNBC (Suleiman A et al., 2018).

El análisis de RNA-seq identificó un total de 4,706 genes desregulados, con 2,663 genes *downregulated* y 2,043 genes *upregulated*. Este análisis, realizado en células tumorales, fue comparado con una línea celular epitelial mamaria no tumoral con sobreexpresión de POU1F1 (HMEC_POU1F1), donde no se observaron cambios significativos en la expresión génica bajo los mismos criterios analíticos. Estos resultados sugieren que la regulación de POU1F1 sobre diferentes genes, especialmente aquellos relacionados con los marcadores de BCSC, es exclusiva de células tumorales. Además, podemos inferir que la desregulación de POU1F1 en células normales de mama no induce procesos asociados con el desarrollo tumoral, como la transición epitelio-mesénquima (EMT) o la activación aberrante de vías de señalización claves. Esto refuerza la hipótesis de que la acción pro-tumorigénica de POU1F1 está restringida al contexto tumoral.

Nuestro siguiente paso fue evaluar específicamente la expresión de POU1F1 y CD24, CD44, CD133 y ALDH en las líneas celulares de cáncer de mama. Demostramos que la sobreexpresión o el bloqueo de POU1F1 va seguido de un aumento o disminución de estos marcadores, respectivamente, en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Luminal A) y MDA-MB-231(TNBC), lo que sugiere que la regulación de CD24, CD44, CD133 y ALDH por POU1F1 es independiente del subtipo de cáncer de mama. Se ha descrito como la expresión de CD44 activa diferentes vías (RhoGTPases y PI3K/AKT) que aumenta la remodelación del citoesqueleto, promueven crecimiento, la supervivencia y la invasión (Louderbough J et al., 2011). Además, se ha descrito que la activación de este receptor puede promover la localización nuclear de NF- κ B para unirse a los promotores de las familias de genes que inducen la progresión tumoral. (Cho Y et al., 2015). Un análisis que utilizó bases de datos de tumores de pacientes, de diferente subtipo tumoral demostró que existe una correlación entre los niveles elevados de expresión de POU1F1 con CD44, CD133 y ALDH.

La citometría de flujo en las células MCF-7 demostró que la sobreexpresión de POU1F1 induce un cambio en las células MCF-7, que pasan de tener un fenotipo CD24⁺/CD44⁻/ALDH^{low} a un tipo CD24⁻/CD44⁺/ALDH^{high}. Este fenotipo ha sido identificado y utilizado para

caracterizar las CSC de tumores de mama desde su descubrimiento en el año 2003 (Al-Haji M et al., 2003). De igual manera, en la línea celular MDA-MB-23, después del bloqueo de la expresión de POU1F1, las células adquirirían un fenotipo tipo $CD24^{+}/CD44^{+}$, y a su vez mostraban una disminución en la expresión de CD133 y la actividad ALDH.

A partir de aquí, nuestro objetivo fue identificar y aislar las células con un fenotipo similar a las BCSC. Empleando citometría de flujo, y considerando que cerca del 95% de las células MCF-7 con sobreexpresión de POU1F1 adquieren un fenotipo $CD24^{-}/CD44^{+}$ característico de las BCSC, decidimos utilizar la actividad enzimática de ALDH como un marcador para seleccionar las células con una mayor similitud a las BCSC. Estas células BCSC se caracterizan por su capacidad para autorrenovarse, inducir progresión tumoral, metástasis y resistencia a la terapia convencional (Ricardo S et al., 2011; Rabinovich I et al., 2018).

Procedimos con la caracterización de la subpoblación de células $ALDH^{high}$ para determinar si estas tenían características funcionales similares a las células troncales cancerosas de mama (BCSC). El primer parámetro evaluado fue su capacidad migratoria, utilizando un ensayo de cierre de heridas, donde se demostró una alta capacidad de migración en las células POU1F1- $ALDH^{high}$. Paralelamente, se midió la capacidad invasiva mediante un ensayo transwell. Los datos obtenidos confirman y respaldan el potencial pro-invasivo de la subpoblación POU1F1- $ALDH^{high}$, lo que coincide con las capacidades invasivas y metastásicas descritas previamente en este tipo de células (Lee, J et al., 2018; Sirkisoon SR et al., 2020; Althobiti M et al., 2020).

Estas propiedades podrían estar asociadas con la EMT inducida por POU1F1 en células tumorales, como ha sido reportado anteriormente por nuestro grupo (Ben-Batalla I et al., 2010). También se evaluó un perfil metabólico de las células POU1F1- $ALDH^{high}$. Esta subpoblación presenta un aumento de la glicólisis basal, lo que puede corresponder a las elevadas demandas energéticas de las BCSC durante procesos de migración e invasión celular (Huang SS et al., 2021). Además, muestran un claro aumento de la glicólisis compensatoria, lo que indicaría una flexibilidad metabólica de las células y su capacidad para adaptarse a situaciones de estrés metabólico, como la hipoxia o estrés oxidativo causado por radicales libres (Hayes J et al., 2020). Previamente en nuestro grupo se había descrito la capacidad de POU1F1 de regular diferentes enzimas relacionadas con la glucólisis (Martinez-Ordoñez et al., 2019). Aunque la glucólisis es generalmente menos eficiente en la producción de ATP que la vía OXPHOS, proporciona a las CSC metabolitos intermediarios significativos que se utilizan en una gran cantidad de vías metabólicas. Entre estos, NADPH o grupos ribosa esenciales para la síntesis

de nucleótidos (García-Heredia, J. 2020). Este aumento en el balance energético de la vía glucolítica podría estar asociado a la capacidad de autorrenovación celular y proliferación, evaluada mediante ensayos clonogénicos y de formación de mamíferas. Se ha descrito como el bloqueo de la glucólisis a nivel de enzimas fundamentales como hexoquinasa 2 (HK2), puede reducir las propiedades de autorrenovación de las células y, en combinación con doxorubicina, disminuye sus propiedades de iniciación tumoral en las CSC (Vlashi E et al., 2011).

Curiosamente la capacidad de formación de mamíferas en la subpoblación celular POU1F1-ALDH^{high} no mostró diferencias significativas en cuanto el volumen de estas estructuras tridimensionales con sus respectivos controles. Este hallazgo resultó inesperado, dado el comportamiento agresivo y el rápido crecimiento celular observado previamente en esta población. Para investigar este suceso más a fondo, utilizamos microscopía confocal de barrido con el fin de analizar la estructura interna de las mamíferas. Los resultados revelaron que, pese a que el tamaño de las mamíferas no cambiaba significativamente, esta subpoblación mostraba un alto grado de compactación interno en las mamíferas derivadas de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high}. Adicionalmente, se evaluaron los marcadores CD49f y EpCAM en estas mamíferas. El fenotipo CD49f⁺/EpCAM⁻ ha sido atribuido a un subtipo de células troncales. Además, se ha estudiado como estas células de fenotipo CD49f⁺/EpCAM⁻ tienen la capacidad de generar diferentes estructuras dentro de la glándula mamaria y diferenciarse a células luminales progenitoras y maduras (Rosenbluth JM et al., 2020); lo que podría indicar que nuestras células podrían tener una mayor capacidad de generar tumores y su posible rol en la diferenciación y organización del TME.

La resistencia a fármacos y tratamientos convencionales es otra de las características que se le han otorgado a las BCSC por su importancia en la supervivencia libre de recaídas. En este trabajo se evaluó la resistencia de la subpoblación POU1F1-ALDH^{high} a radiación y la resistencia a tamoxifeno, modulador selectivo del receptor de estrógenos que se utiliza de forma convencional para tratar el cáncer de mama subtipo Luminal A (Nolan E et al., 2023). En ambos tratamientos, tanto de forma individual como combinada, los datos muestran la alta capacidad de resistencia de esta subpoblación POU1F1-ALDH^{high}, lo que podría estar asociado a múltiples factores. Se ha descrito que la activación de Wnt/ β -catenina está involucrada en la quimiorresistencia BC y la radiorresistencia (Zhang Z et al. 2016), unas de las vías que está regulada por la sobreexpresión de POU1F1 en los datos de transcriptómica del RNA-seq. Específicamente, la actividad ALDH en nuestra subpoblación de estudio parece conferir a las

células de diversos mecanismos de resistencia. Se ha documentado que las CSC con sobreexpresión de ALDH exhiben niveles significativamente más bajos de especies reactivas de oxígeno (ROS), en comparación con las células cancerosas diferenciadas. Este fenómeno se atribuye a la activación de mecanismos antioxidantes, mediada principalmente por la expresión de enzimas como GPX3, SOD-2 y HO-1, reguladas a través de la vía de señalización de NRF2 (Gorrini C et al., 2013 y Mizuno T et al., 2015). En el cáncer de mama específicamente, una alta actividad de ALDH se ha relacionado también con la resistencia a otros tratamientos a través de la sobreexpresión de PARP1 (Gilabert M et al., 2014).

A continuación, examinamos la capacidad de POU1F1-ALDH^{high} para apoyar la tumorigénesis *in vivo* utilizando un modelo de xenoinjerto de ratón desnudo. Ha sido bien descrito como la reaparición de tumores se relaciona con las BCSC y el potencial de estas células para generar nuevos tumores a partir de una sola célula. El ensayo de iniciación tumoral mediante dilución limitante reveló que la probabilidad de formación de tumores fue mayor en POU1F1-ALDH^{high} en comparación con las células MCF-7 y MCF-7_POU1F1. La inyección de células POU1F1-ALDH^{high} indujo una mayor frecuencia en la formación de tumores, lo que demuestra que esta subpoblación POU1F1-ALDH^{high} presenta propiedades de célula troncal/progenitora capaz de generar tumores. Estas células llamadas células iniciadoras de tumor (por sus siglas en inglés, *tumor-initiating cells* TICs) generan un microambiente espacialmente favorable para la progresión invasiva y la resistencia a los medicamentos (Taniguchi S et al., 2020). Se ha descrito como específicamente la isoforma ALDH1A1 en TIC promueve la progresión tumoral en cáncer de mama a través de la modulación del sistema inmune (Cuicui L et al., 2021). En otros tipos de tumores se ha descrito como estas TIC tienen un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de sustancias, fosforilación oxidativa y metabolismo de ROS aumentando así las capacidades de quimiorresistencia y consecuentemente provocan la recaída en la enfermedad (Harrington B et al., 2020)

A partir de aquí intentamos explicar si la elevada actividad ALDH de las células podía atribuirse parcialmente a la activación de la vía IL-6/JAK/ STAT3, la cual se muestra regulada al alza en el análisis de datos RNA-seq. La activación anormal de la señalización JAK/STAT3, mediada por la secreción IL-6 se correlaciona positivamente con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la metástasis en tumores de pulmón (Hu Z et al., 2024). Se ha descrito

como la fosforilación STAT3 en diferentes posiciones regula diferencialmente el proceso EMT-MET dentro de los distintos subtipos moleculares de CSC (Liu C et al., 2021).

Los datos mostraron que los niveles de IL-6 libre en el medio aumentaban significativamente, lo que podría derivar en una regulación autocrina y paracrina de la vía. Además, el aumento significativo de fosforilación de STAT3 activa proteínas como AKT y ERK1/2 descritas por su papel en el metabolismo celular, la proliferación, la metástasis y los mecanismos de mantenimiento de las BCSC (Saghar Y et al., 2020). También evaluamos si la inhibición de la fosforilación en STAT3 podría disminuir la actividad ALDH. Después de tratar las células con inhibidores de las *Janus kinasas*, disminuía la fosforilación de STAT3 y la actividad ALDH de las células con sobreexpresión de POU1F1. Previamente se han descrito altos niveles de STAT3 fosforilado en células ALDH^{high}, observándose una correlación significativa entre la tinción nuclear de STAT3 fosforilado y la expresión de ALDH1 en tejidos de cáncer de mama (Lin L et al. 2013). La activación de STAT3 ha sido relacionada con la promoción de la expresión de c-MYC, KLF4 y SOX9, factores que favorecen la autorrenovación de las CSC-ALDH^{high} (Ma Y et al., 2023). Además, se ha identificado que STAT3 impulsa la autorrenovación y quimiorresistencia de las BCSC mediante la regulación de la oxidación de ácidos grasos β (Wang T et al. 2018). El papel emergente de la vía IL-6/JAK/STAT3 en la promoción de las subpoblaciones de BCSC y las metástasis del cáncer de mama *in vivo* resalta su potencial terapéutico para atacar el eje de señalización IL-6/JAK/STAT3 en el cáncer de mama metastásico.

De acuerdo con los datos obtenidos, la desregulación POU1F1 es capaz de inducir características BCSC en las células tumorales. Hemos descrito como POU1F1 es capaz de generar una subpoblación de células BCSC-*like* con un elevado potencial de agresividad, altas capacidades de migración y extravasación y resistencia a terapias convencionales. Además, POU1F1 parece estar activando la señalización IL-6/STAT3, vía ampliamente descrita en la tumorogénesis que puede promover la metástasis del cáncer de mama y al mismo tiempo suprimir la respuesta inmune antitumoral. Por tanto, estos factores podrían usarse como objetivos de pronósticos y dianas terapéuticas en tumores de mama. La figura 29 representa un resumen de nuestros hallazgos.

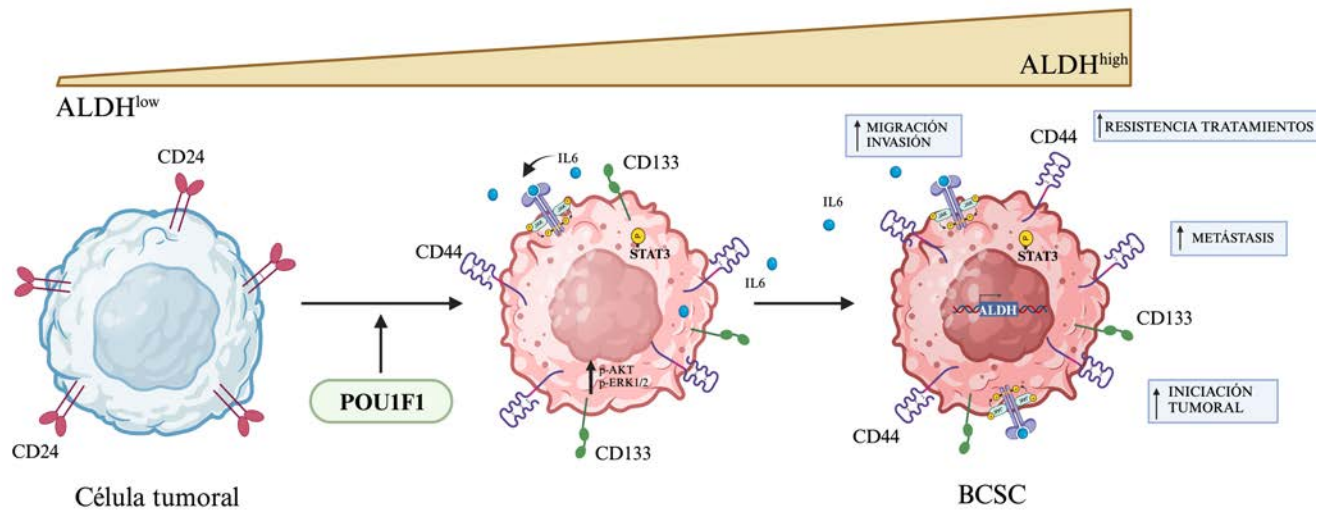


Figura 29. Representación esquemática de como la sobreexpresión POU1F1 en tumores de mama induce la transformación de una célula tumoral a una BCSC. Dentro de las células POU1F1 se generan subpoblaciones ALDH^{high} con mayor potencial invasión, migración, elevada actividad metabólica y resistencia a tratamientos. Además, el aumento de la secreción de interleuquinas como IL-6 produce la activación de la vía IL-6/STAT3 que promueve la actividad ALDH.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción POU1F1 regula la expresión de marcadores de BCSC en líneas celulares de cáncer de mama.
2. La subpoblación celular de MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) con elevados niveles de POU1F1 y ALDH muestra un fenotipo similar a las BCSC en relación con el metabolismo, con propiedades de migración e invasión, y formación de colonias y mamosferas.
3. La subpoblación de células MCF-7 con elevados niveles de POU1F1 y ALDH tiene mayor potencial de iniciación tumoral, desarrollo de metástasis y mayor resistencia a quimioterapia y radioterapia.
4. Se sugiere que el factor de transcripción POU1F1 podría regular la diferenciación de célula tumoral a BCSC a través de la vía IL-6/STAT3 y la activación de ALDH en células de cáncer de mama.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Allison S, Chen Y, Petrovic N, Zhang J, Bourget K, Mackenzie PI, Murray M. Activation of ALDH1A1 in MDA-MB-468 breast cancer cells that over-express CYP2J2 protects against paclitaxel-dependent cell death mediated by reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology* 2017; 143: 79-89.

Althobiti M, El Ansari R, Aleskandarany M, Joseph C, Toss MS, Green AR, Rakha EA, The Prognostic Significance of ALDH1A1 Expression in Early Invasive Breast Cancer. *Histopathology* 2020; 77: 437-448.

Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJP, Cukierman E. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *The American Journal of Pathology* 2005; 167: 475-488.

An Y, Ongkeko WM. ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2009; 5: 1529-1542.

Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040. *Breast* 2022; 66: 15-23.

Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine* 2017; 23: 1124-1134.

Ben-Batalla I, Seoane S, Garcia-Caballero T, Gallego R, Macia M, Gonzalez LO, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Deregulation of the Pit-1 transcription factor in human breast cancer cells promotes tumor growth and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; 120: 4289-4302.

Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 1988; 3: 505-518.

Bohaumilitzk L, Ann-Kathrin H, Stork EV, Wengert S, Franziska W, HeikeB. A trickster in disguise: hyaluronan's ambivalent roles in the matrix. *Frontiers in Oncology* 2017; 7: 242-256.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; 3: 730-737.

Boumahdi S, Sauvage F. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020; 19: 39-56.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells-an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Review Cancer* 2005; 5: 744–749.

Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current Opinion in Cell Biology* 2012; 24: 645-651.

Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 2009; 15: 79-80.

Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761-1767.

Carter JC, Church FC. Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. *Experimental and Molecular Pathology* 2012; 92: 312-317.

Castrillo JL, Theill LE, Karin M. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 1991; 253: 197-199.

Cazet AS, Hui MN, Elsworth BL, Wu SZ, Roden D, Chan C-L, Skhinas JN, Collot R, Yang J, Harvey K, Johan MZ, Cooper C, Nair R, Herrmann D, McFarland A, Deng N, Ruiz-Borrego M, Rojo F, Trigo JM, Bezares S, Caballero R, Lim E, Timpson P, O'Toole S, Watkins DN, Cox TR, Samuel MS, Martín M, Swarbrick A. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nature Communication* 2018; 9: 2897-2915.

Chen C, Wu Y, Li J, Wang X, Zeng Z, Xu J, Liu Y, Feng J, Chen H, He Y, Xia R. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant* 2016; 16: 1733-1742.

Cheng T, Hui Z, Wen-Sheng D, Ling-Qiang X, Li-Qiang ZK. Role of POU1F1 promoting the properties of stemness of gastric carcinoma through ENO1-mediated glycolysis reprogramming. *Journal of Medical Sciences* 2023; 39: 904-915.

Cho Y, Lee H-W, Kang H-G, Kim H-Y, Kim S-J, Chun K-H. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 8709-8721.

Ciccone V, Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Morbidelli L, Ziche M. Stemness marker ALDH1A1 promotes tumor angiogenesis via retinoic acid/HIF-1 α /VEGF signalling in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018; 37: 311-345.

Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine* 2011; 17: 313-319.

Cohen LE, Wondisford FE, Radovick S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 1996; 25: 523-540.

Crabtree JS, Miele L. Breast cancer stem cells. *Biomedicines* 2018; 6: 77-91.

Cuicui L, Jiankun Q, Qiaodan D, Jie X, Lu D, Lei Z, Dong W, Xueyan H, Ying L, Botao Z, Jinhui L, Zuoren Y, Qun-Ying L, Zhi-Ming S, Xiao-Yong Z, Lixing Z, Suling L. ALDH1A1 Activity in Tumor-Initiating Cells Remodels Myeloid-Derived Suppressor Cells to Promote Breast Cancer Progression. *Cancer Research* 2021; 81: 5919-5934.

Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 2012; 488: 527-530.

Emma N, Geoffrey JL, Jane EV. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell* 2023; 168: 1708-1728.

Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell* 2010; 17: 135-147.

Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunology Research* 2014; 2: 187-193.

Flint TR, Janowitz T, Connell CM, Roberts EW, Denton AE, Coll AP, Jodrell DI, Fearon DT. Tumor-induced IL-6 reprograms host metabolism to suppress anti-tumor immunity. *Cell Metabolism* 2016; 24: 672-684.

Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012; 33: 949-955.

Furth J, Kahn M. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *American Journal of Cancer* 1937; 31: 276-282.

Gaiddon C, Tapia M, Loeffler JP. The tissue-specific transcription factor Pit-1/GHF-1 binds to the c-fos serum response element and activates c-fos transcription. *Molecular Endocrinology* 1999; 13: 742-751.

Gao Z, Xue K, Zhang L, Wei M. Over-expression of POU class 1 homeobox 1 transcription factor (Pit-1) predicts poor prognosis for breast cancer patients. *Medical Science Monitor* 2016; 22: 4121-4125.

García-Heredia JM, Carnero A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. *Cells* 2020; 9: 1693-1722.

Gentry T, Foster S, Winstead L, Deibert E, Fiordalisi M, Balber A. Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. *Cytotherapy* 2007; 9: 259-274.

Gil-Puig C, Seoane S, Blanco M, Macia M, Garcia-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R. Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 335-344.

Gil-Puig C, Blanco M, Garcia-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R. Pit-1/GHF-1 and GH expresión in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. *Journal of Endocrinology.* 2002; 173:161-167

Gilbert M, Launay S, Ginestier C, Bertucci F, Audebert S, Pophillat M, Toiron Y, Baudalet E, Finetti P, Noguchi T, Sobol H, Birnbaum D, Borg J-P, Charafe-Jauffret E, Gonçalves A. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One* 2014; 9:1567-1592.

Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Review Drug Discovery* 2013; 12: 931-947.

Harrington BS, Ozaki MK, Caminear MW, Hernandez LF, Jordan E, Kalinowski NJ, Goldlust IS, Guha R, Ferrer M, Thomas C, Shetty J, Tran B, Wong N, House C, Annunziata CM. Drugs Targeting Tumor-Initiating Cells Prolong Survival in a Post-Surgery, Post-Chemotherapy Ovarian Cancer Relapse Model. *Cancers* 2020; 12: 1645-1879.

Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica* 1995;154: 8-20.

He M, Peng A, Huang X-Z, Shi D-C, Wang J-C, Zhao Q, Lin H, Kuang D-M, Ke P-F, Lao X-M. Peritumoral stromal neutrophils are essential for c-Met-elicited metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 2016; 5: 1219-1258.

Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 3070-3075.

Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G. The POU domain; a large, conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes & Development* 1988; 2: 1513-1516.

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, Dyke TV, Perou CM. Identification of conserved

gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology* 2007; 8: R76.

Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research* 2019; 79: 4557-4566.

Hayes D, Albena T, Dinkova-Kostova KD. Tew Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* 2020; 38: 167-197.

Joseph C, Arshad M, Kurozomi S, Althobiti M, Miligy IM, Al-Izzi S, Toss MS, Goh FQ, Johnston SJ, Martin SG, Ellis IO, Mongan NP, Green AR, Rakha EA. Overexpression of the cancer stem cell marker CD133 confers a poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2019; 174: 387-399.

Kangchen Chen, Chenzhi Zhang, Sunbin Ling, Rongli Wei, Jianguo Wang & Xiao Xu. The metabolic flexibility of quiescent CSC: implications for chemotherapy resistance. *Cell Death & Disease* 2021; 12: 835.

Khoo BL, Lee SC, Kumar P, Tan TZ, Warkiani ME, Ow SG, Nandi S, Lim CT, Thiery JP. Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy. *Oncotarget* 2015; 6: 15578-15593.

Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflammation* 2016; 56: 1-11.

Korkaya H, Paulson A, Charade-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, Clouthier SG, Wicha MS. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biology* 2009; 7: 100-121.

Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM, van der Heijden M, Zecchini HI, Kemp R, Tavaré S, Vermeulen L, Winton DJ. Continuous clonal labeling reveals small numbers of functional stem cells in intestinal crypts and adenomas. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 626-633.

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 275-

Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW, Goodrich MM, Labbé DP, Gomez EC, Wang J, Long HW, Xu B, Brown M, Loda M, Sawyers CL, Ellis L, Goodrich DW. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* 2017; 355: 78-83.

Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Review* 2009; 28: 113-127.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2014; 15: 178-196.

Lawson D, Bhakta NR, Kessenbrock K, Prummel KD, Yu Y, Takai K, Zhou A, Eyob H, Balakrishnan S, Wang C-Y, Yaswen P, Goga A, Werb Z. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 2015; 526:131-135.

Lee JS, Kim WG. Cutaneous Metastases of Breast Cancer during Adjuvant Chemotherapy Correlates with Increasing CD44+/CD24- and ALDH-1 Expression: A Case Report and Literature Review. *Stem Cell Investigation* 2018; 5: 7.

Li S, Crenshaw EB, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 1990; 347: 528-533.

Li Y, Le TMD, Bui QN, Yang HY, Lee DS. Tumor acidity and CD44 dual targeting hyaluronic acid-coated gold nanorods for combined chemo- and photothermal cancer therapy. *Carbohydrate Polymers* 2019; 226:115281.

Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, Rowlands T, Egeblad M, Cowin P, Web Z, Tan LK, Rosen JM, Varmus HE. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 15853-15858.

Liguori M, Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages as incessant builders and destroyers of the cancer stroma. *Cancers* 2011; 3: 3740-

3761.

Lim Y-Y, Wright JA, Attema JL, Gregory PA, Bert AG, Smith E, Thomas D, Lopez AF, Drew PA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem-cell-like state. *Journal of Cell Science* 2013; 126: 2256-2266.

Lin C-Y, Barry-Holson KQ, Allison KH. Breast cancer stem cells: are we ready to go from bench to bedside?. *Histopathology* 2016; 68: 119-137.

Lin L, Hutzen B, Lee H-F, Peng Z, Wang W, Zhao C, Lin H-J, Sun D, Li P-K, Li C, Korkaya H, Wicha MS, Lin J. Evaluation of STAT3 signaling in ALDH+ and ALDH+/CD44+/CD24- subpopulations of breast cancer cells. *PLoS One* 2013; 8: 82821.

Liu BY, McDermott SP, Khwaja SS, Alexander CM. The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 4158-4163.

Liu C-C, Lin J-H, Hsu T-W, Su K, Li AF-Y, Hsu H-S, Hung S-C. IL-6 enriched lung cancer stem-like cell population by inhibition of cell cycle regulators via DNMT1 upregulation. *International Journal of Cancer* 2015; 136: 547-559.

Liu C, Qiang J, Deng Q, Xia J, Deng L, Zhou L, Wang D, He X, Liu Y, Zhao B, Lv J, Yu Z, Lei Q-Y, Shao Z-M, Zhang X-Y, Zhang L, Liu S. ALDH1A1 activity in tumor-initiating cells remodels myeloid-derived suppressor cells to promote breast cancer progression. *Cancer Research* 2021; 81: 5919-5934.

Louderbough JMV, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular Cancer Research* 2011; 9: 1573-1578.

Huber MA, Krau N, Beug H. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Cell Biology* 2005; 17: 548-558.

Ma Y, Zhu Y, Shang L, Qiu Y, Shen N, Wang J, Adam T, Wei W, Song Q, Li J, Wicha MS, Luo M. LncRNA XIST regulates breast cancer stem cells by activating proinflammatory IL-6/STAT3 signaling. *Oncogene* 2023; 42: 1419-1437.

Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715.

Marotta LLC, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R, Wu Z, Gönen M, Mulvey LA, Bessarabova MO, Huh SJ, Silver SJ, Kim SY, Park SY, Lee HE, Anderson KS, Richardson AL, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Liu XS, Root DE, Hahn WC, Frank DA, Polyak K. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44⁺CD24⁻ stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *Journal Clinical Investigation* 2011; 121: 2723-2735.

Martínez-Ordoñez A, Seoane S, Avila L, Eiro N, Macía M, Arias E, Pereira F, García-Caballero T, Gómez-Lado N, Aguiar P, Vizoso F, Perez-Fernandez R. POU1F1 transcription factor induces metabolic reprogramming and breast cancer progression via LDHA regulation. *Oncogene* 2021; 40: 2725-2740.

Martinez-Ordoñez A, Seoane S, Cabezas P, Eiro N, Sendon-Lago J, Macia M, Garcia-Caballero T, Gonzalez LO, Sanchez L, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis. *Oncogene* 2018; 37: 1430-1444.

Merrell AJ, Stanger BZ. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2016; 17: 413-425.

Mizuno T, Suzuki N, Makino H, Furui T, Morii E, Aoki H, Kunisada T, Yano M, Kuji S, Hirashima Y, Arakawa A, Nishio S, Ushijima K, Ito K, Itani Y, Morishige K. Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species. *Gynecology Oncology* 2015; 137: 299-305.

Motta JM, Rumjanek VM. Sensitivity of dendritic cells to microenvironment signals.

Journal of Immunology Research 2016; 2016: 4753607.

Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, Yamada SD, Peter ME, Gwin K, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature Medicine* 2011; 17: 1498-1503.

O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, Dewar R, Rocha RM, Brentani RR, Resnick MB, Neilson EG, Zeisberg M, Kalluri R. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 16002-16007.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research* 1999; 59:5002-5011.

Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting breast cancer stem cells to overcome treatment resistance. *Molecules* 2018; 23: 2193.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406: 747-752.

Pham PV, Phan NLC, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le DV, Truong KD, Phan NK. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *Journal of Translational Medicine* 2011; 9: 209.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 225-238.

Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Frontiers Oncology* 2018; 8: 431.

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 Research* 2005; 65: 5506–5511.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010; 12: 68.

Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecology and Obstetrics* 2014; 124: 1-5.

Provenzano Paolo , David R Inman, Kevin W Eliceiri, Justin G Knittel, Long Yan, Curtis T Rueden, John G White, Patricia J Keely. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine* 2008; 6: 11.

Qin L, Wu Y-L, Toneff MJ, Li D, Liao L, Gao X, Bane FT, Tien JC-Y, Xu Y, Z, Yang Z, Xu Y, Theissen SM, Li Y, Young L, Xu J. NCOA1 directly targets M-CSF1 expression to promote breast cancer metastasis. *Cancer Research* 2014; 74: 3477-3488.

Rabinovich I, Sebastião APM, Lima RS, Urban CDA, Junior ES, Anselmi KF, Elifio-Esposito S, Noronha L, Moreno-Amaral AN. Cancer stem cell markers ALDH1 and CD44+/CD24- phenotype and their prognosis impact in invasive ductal carcinoma. *European Journal of Histochemistry* 2018; 62: 2943.

Reya R, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal Clinical of Pathology* 2011; 64: 937-946.

Ring BZ, Seitz RS, Beck R, Shasteen WJ, Tarr SM, Cheang MCU, Yoder BJ, Budd GT, Nielsen TO, Hicks DG, Estopinal NC, Ross DT. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24: 3039-3047.

Rosenbluth JM, Schackmann R, Kenneth G, Selfors LM, Man-Chung L, Boedicker M, Kuiken HJ, Richardson A, Brock J, Garber J, Dillon D, Sachs N, Clevers H, Brugge J. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nature Communication* 2020; 11: 1711.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 5678-5685.

Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2007; 17: 52-59.

Saghar Y, Farzad S, Shiva S, Mohammad H, Ali OG, Kamran G. Mechanistic Pathways of Malignancy in Breast Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology* 2020; 10: 452.

Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T, Hynes RO, Jain RK, Janowitz T, Jorgensen C, Kimmelman AC, Kolonin MG, Maki RG, Powers RS, Puré E, Ramirez DC, Scherz-Shouval R, Sherman MH, Stewart S, Tlsty TD, Tuveson DA, Watt FM, Weaver V, Weeraratna AT, Werb Z. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Review Cancer* 2020; 20: 174-186.

Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, Hooper S, Mitter R, Féral CC, Cook M, Larkin J, Marais R, Meneguzzi G, Sahai E, Marshall CJ. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* 2011; 20: 229-245.

Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, Van den Born M, van Es JH, Van de Wetering M, Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 2012; 337: 730–735.

Seoane S, Martinez-Ordoñez A, Eiro N, Cabezas-Sainz P, Garcia-Caballero L, Gonzalez LO, Macia M, Sanchez L, Vizoso F, Perez-Fernandez R. POU1F1 transcription

factor promotes breast cancer metastasis via recruitment and polarization of macrophages. *Journal of Pathology* 2019; 249: 381-394.

Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, Christensen JG, Wain JC, Lynch TJ, Vernovsky K, Mark EJ, Lanuti M, Iafrate AJ, Minn-Kenudson M, Engelman JA. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science Translational Medicine* 2011; 3: 75.

Huang SS, Liao WL, Hsu CC, Chan TS, Liao TY, Yang PM, Chen LT, Sung SY, Kelvin KT. A Novel Invadopodia-Specific Marker for Invasive and Pro-Metastatic Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology* 2021; 11: 638311.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *Cancer Journal for Clinicians* 2023; 73: 17-48.

Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Doheny D, Zhu D, Aguayo NR. TGLI1 transcription factor mediates breast cancer brain metastasis via activating metastasis-initiating cancer stem cells and astrocytes in the tumor microenvironment. *Oncogene* 2020; 39: 64–78.

Sjöström M, Hartman L, Honeth G, Grabau D, Malmström P, Hegardt C, Fernö M, Niméus E. Stem cell biomarker ALDH1A1 in breast cancer shows an association with prognosis and clinicopathological variables that is highly cut-off dependent. *Journal Clinical of Pathology* 2015; 68: 1012–1019.

Song JM, Im J, Nho RS, Han YH, Upadhyaya P, Kassie F. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 2019; 58: 321-333.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. 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* 2001; 98: 10869-10874.

Steinbichler TB, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova I-I. Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology* 2018; 53: 156-167.

Sulaiman A, McGarry S, Li L, Jia D, Ooi S, Addison C, Dimitroulakos J, Arnaout A, Nessim C, Yao Z, Ji G, Song H, Gadde S, Li X, Wang L. Dual inhibition of Wnt and Yes-associated protein signaling retards the growth of triple-negative breast cancer in both mesenchymal and epithelial states. *Molecular Oncology* 2018; 12: 423-440.

Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, 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. *Clinical Cancer Research* 2009; 15: 4234-4241.

Tang C, Zhang H, Deng W-S, Xiong L-Q, Zhou L-Q. Role of POU1F1 promoting the properties of stemness of gastric carcinoma through ENO1-mediated glycolysis reprogramming. *Kaohsiung Journal Medical Sciences* 2023; 39: 904-915.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 2012; 22: 457-472.

Taniguchi S, Ajit E, Van Duzer A, Leitenberger J, Oshimor N. Tumor-initiating cells establish an IL-33–TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression. *Science* 2020; 369: 501.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 11018-11032.

Traore M, Zhai L, Chen M, Olsen CE, Odile N, Pierre GI, Bosco OJ, Robert GT, Christensen SB. Cytotoxic kurubasch aldehyde from *Trichilia emetica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 21: 13–17.

Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Maiorano E, MacGrogan G, Braye SG, Ohlschlegel C, Neven P, Orosz Z, Olszewski WP, Knox F, Thürlimann B, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Gusterson BA, Goldhirsch A. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *Journal Clinical Oncology* 2008; 26: 5569-5575.

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, Popescu R, Della Donna L, Evers P, Dekmezian C. Metabolic State of Glioma Stem Cells and Nontumorigenic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 16062–6067.

Wang Q, Jiang J, Ying G, Xie XQ, Zhang X, Xu W, Zhang X, Song E, Bu H, Ping Y-F, Yao X-H, Wang B, Xu S, Yan Z-X, Tai Y, Hu B, Qi X, Wang Y-X, He Z-C, Wang Y, Wang JM, Cui Y-H, Chen F, Meng K, Wang Z, Bian X-W. Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ERalpha36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Research* 2018; 28: 336–358.

Wang T, Farhmann JF, Lee H, Li Y-J, Tripathi SC, Yue C, Zhang C, Lifshitz V, Song J, Yuan Y, Somlo G, Jandial R, Ann D, Hanash S, Jove R, Yu H. JAK/STAT3-Regulated fatty acid β -oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. *Cell Metabolic* 2018; 27: 136-150.

Winningham AH, Camper SA. Pituitary stem cell regulation by Zeb2 and BMP signaling. *Endocrinology* 2023; 164: 1-11.

Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 2021; 221: 107753.

Ye F, Qiu Y, Li L, Yang L, Cheng F, Zhang H, Wei B, Zhang Z, Sun L, Bu H. The presence of EpCAM(-)/CD49f (+) cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *Journal Breast Cancer* 2015; 18: 242-248.

Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *British Journal of Cancer* 2014; 110: 724-732.

Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discovery* 2019; 9: 837-851.

Zhang X, Powell K, Li L. Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond. *Cancers* 2020; 12:3765.

Zhang Z, Wu, J; Luo C, Liu Q, Wu Q; Ye G. Pygo2 activates MDR1 expression and mediates chemoresistance in breast cancer via the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene* 2016; 35: 4787–4797.

Zhao X, Qu J, Sun Y, Wang J, Liu X, Wang F, Zhang H, Wang W, Ma X, Gao X, Zhang S. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* 2017; 8: 30576-30586.

Zuoren Y, Pestell T, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer Stem Cell. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2012; 44: 2144-2151.

11. ANEXOS

11.1. CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN PARA LA MANIPULACIÓN DE ANIMALES FUNCIONES B Y C.



Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: ÁVILA CONCEPCIÓN		
1.2. Nome / Nombre / First names: LEANDRO	DNI / DNI / Identity card number: Y6472665L	
1.3. Categoría / Categoría / Category: "b"	1.4. Especies / Especies / Species: ROEDORES	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: 24/10/2028
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
B575		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 657	3.3. Fax / Fax / Fax: 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmr@xunta.es
3.5. Data / Fecha / Date:	3.6. Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature Asdo.: Xiana Maria Perates Arroyo Xefa do Departamento de Formación (asinado dixitalmente)		

Adicado por PERALES ARROYO, XIANA MARIA
 Cargo: Xefa do Servizo
 Data e hora: 20/10/2021 08:11:54

CVE: 01631WVW8B
 Verificación: https://sede.xunta.gal/cve





Avda. Do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña



Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN			
1.1. Apellidos / Apellidos / Surname: ÁVILA CONCEPCIÓN			
1.2. Nome / Nombre / First names: LEANDRO			DNI / DNI / Identity card number: Y6472665L
1.3. Categoría / Categoría / Category: "C"	1.4. Especies / Especies / Species: ROEDORES	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: 24/10/2028	
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER			
C611			
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:			
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)			
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 657	3.3. Fax / Fax / Fax: 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmrn@xunta.es	
3.5. Data / Fecha / Date:	3.6. Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela		
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature Asdo.: Xiana María Perales Arroyo Xefa do Departamento de Formación (asinado dixitalmente)			

Adinado por PERALES ARROYO, XIANA MARIA
 Cargo: Xefa do Servizo
 Data e hora: 28/10/2021 09:11:05

CVE: 65VWVFZ07
 Verificación: https://sede.xunta.gal/cve



11.2. PERMISOS DEL COMITÉ BIOÉTICO PARA TRABAJO CON ANIMALES

Denominación del proyecto: Cáncer de mama: célula tumoral e estroma como dianas terapéuticas de células nai e análogos de vitamina D

Persona Responsable del Proyecto: Román Pérez Fernández

Código Proyecto: 15012/2020/013



Xefatura Territorial
Servizo Xurídico - Administrativo



CERTIFICADO DE SILENZO ADMINISTRATIVO POSITIVO

Mónica María López López, xefa territorial en A Coruña da Consellería do Medio Rural, no exercizo das competencias que lle atribúe o Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro) é competente para ditar resolución no procedemento iniciado por Román Pérez Fernández como representante da Universidade de Santiago de Compostela con data 2.03.2016 para a autorización para realizar o proxecto de investigación (entrada no Rexistro da Xunta de Galicia 25655/RX 538237), cos seguintes datos:

Denominación do proxecto: *Cáncer de mama: célula tumoral e estroma como dianas terapéuticas de células nai e análogos de vitamina D.*

Nome do centro usuario: Animalario do CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Román Pérez Fernández

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario do CIMUS

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

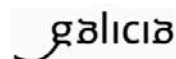
De conformidade co establecido nos artigos 21 e 24 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas, a Disposición Adicional Terceira da Lei 32/2007, de 7 de novembro, para o coidado dos animais na súa explotación, transporte, experimentación e sacrificio e o artigo 33 do Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, o prazo máximo para resolver e notificar a correspondente resolución é de 40 días hábiles, rematando o 19.04.2016, data na que venceu o prazo sen que o procedemento fora expresamente resolto, entendéndose estimada a solicitude presentada polo interesado.

En consecuencia, e en cumprimento do establecido no artigo 24 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas





Xefatura Territorial
Servizo Xurídico - Administrativo



Certifica:

Que os efectos da resolución do procedemento iniciado por solicitude presentada por Román Pérez Fernández como representante da Universidade de Santiago de Compostela con data 2.03.2016 para a autorización para realizar o proxecto de investigación *Cáncer de mama: célula tumoral e estroma como dianas terapéuticas de células nai e análogos de vitamina D* son estimatorios dende o 19.04.2020 , e xerados pola falta de resolución expresa dacordo co fundamento xurídico exposto .

A Coruña,
A xefa territorial
(Asinado dixitalmente)

O que se notifica ao interesado facéndolle saber que, contra o acto presunto que se certifica neste documento, que non pon fin á vía administrativa, cabe interpor recurso de alzada, en calquera momento a partir do día seguinte a aquel no que se produciron os efectos do silencio administrativo, de conformidade co artigo 122 da Lei 39/2015, do 1 de outubro, do Procedemento Administrativo Común das Administracións Públicas.

Asinado por: LÓPEZ LOPEZ, MONICA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 13/09/2020 14:31:21

CVE: H4XN0LgN6
Validador: <https://sede.xunta.gal/ve>





VICERREITORADO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: oit@info@usc.es
<http://imaisd.usc.es>

Informe del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago

El CEEA de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el Campus de Santiago, tras evaluar el Proyecto titulado “Cáncer de mama: célula tumoral y estroma como dianas terapéuticas de células madre y análogos de vitamina D” del que es Investigador Responsable D. Román Pérez Fernández, acordó con fecha 11 de Enero de 2016 emitir


INFORME FAVORABLE

para la realización de dicho proyecto, así como los procedimientos que incluye, en las instalaciones del establecimiento usuario Animalario del CIMUS, con número de registro ES150780275701, siempre que, en cumplimiento del RD 53/2013, se obtenga la correspondiente autorización administrativa.

En Santiago, a 11 de Enero de 2016


Fdo. El secretario


Fdo. El presidente

Responsable administrativo:	Nombre: Raúl Vieira Miguel Cargo: Director de la RIAIDT de la USC 
-----------------------------	---





VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: citinfo@usc.es
<http://fmais.usc.es>

JOSÉ MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, cuya Sección de Experimentación animal ha sido designada como Órgano habilitado para la evaluación de proyectos de experimentación animal por resolución de la Xunta de Galicia, con fecha 11 de noviembre de 2013, de acuerdo con lo exigido por el RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia,

INFORMA:

Que el proyecto de investigación titulado: **“Cáncer de mama: célula tumoral y estroma como dianas terapéuticas de células madre y análogos de vitamina D”** del que es investigadora responsable D. **Román Pérez Fernández**, ha sido examinado por el Comité de Bioética de esta Universidad, Sección de Experimentación Animal, reunido el siete de enero del presente año, llegando a las siguientes conclusiones:

- Con respecto a su finalidad, se trata de un proyecto de investigación traslacional o aplicada cuyo objetivo es investigar dos nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer de mama contra el desarrollo de metástasis a distancia, que contemplan no sólo las propias células tumorales como diana, sino también los elementos celulares del estroma tumoral que, como las células mononucleares inflamatorias y fibroblastos, pueden favorecer la progresión tumoral. Además se quiere evaluar el tratamiento de células tumorales y del estroma con medio condicionado de células madre uterinas y con el análogo de vitamina D PG-136.
- Con respecto a los requisitos de las 3Rs,
 - No cabe la posibilidad de reemplazo ya no es posible, con los datos actuales, utilizar otros medios alternativos, debido a que se necesitan hacer experimentos con ratones inmunodeficientes para la generación de tumores de células humanas
 - La experimentación se realizará en un centro registrado como usuario de animales de experimentación por lo que la manipulación, manejo y supervisión de los animales durante todo el proyecto será llevada a cabo por personas capacitadas. El grupo investigador lo componen personas con capacitaciones que A, B y C, lo que asegura su preparación para garantizar el bienestar animales durante todos los procedimientos (requisito de refinamiento).
 - Finalmente, con respecto al requisito de reducción, este Comité considera que el número de animales a utilizar es el adecuado estadísticamente para la obtención de unos resultados significativos
- La clasificación de los procedimientos en función de su grado de severidad es de “moderado”.
- Con respecto al balance de los daños y los beneficios, el procedimiento no genera dolor, angustia ni sufrimiento, y los animales solo se espera que padezcan una ligera pérdida de peso. Los métodos de sacrificio descritos (CO₂) se encuentran entre los indicados por el propio RD 53/2013.
- Se han examinado las situaciones y excepciones previstas en el punto e) del artículo 34. 2 encontrando que ninguna de ellas es aplicable en este proyecto.
- El proyecto no debe ser sometido a evaluación retrospectiva.



VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Servizo de Convocatorias e Recursos Humanos de I+S
Edificio CACTUS – Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077
Correo electrónico: citinfo@usc.es
<http://irmaisd.usc.es>

Por todas estas razones, este Comité acordó emitir un **INFORME FAVORABLE**.

En la evaluación de este proyecto NO HA EXISTIDO CONFLICTO DE INTERESES.

Lugo, 15 de febrero de 2016

11.3. DERECHOS PARA LA PUBLICACIÓN DE FIGURAS GENERADAS EN BIORENDER

Figura 3.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

October 14th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: MJ27FBC1ED
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/e36p877](https://www.biorender.com/e36p877)

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/e36p877](https://www.biorender.com/e36p877)".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.

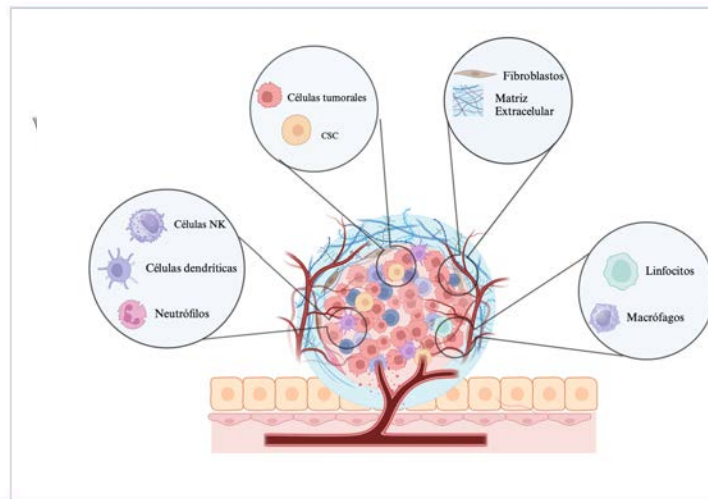


Figura 13A.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 26th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: CK27CQ6GUZ
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/o54v157](https://www.biorender.com/o54v157)

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/o54v157](https://www.biorender.com/o54v157)".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.

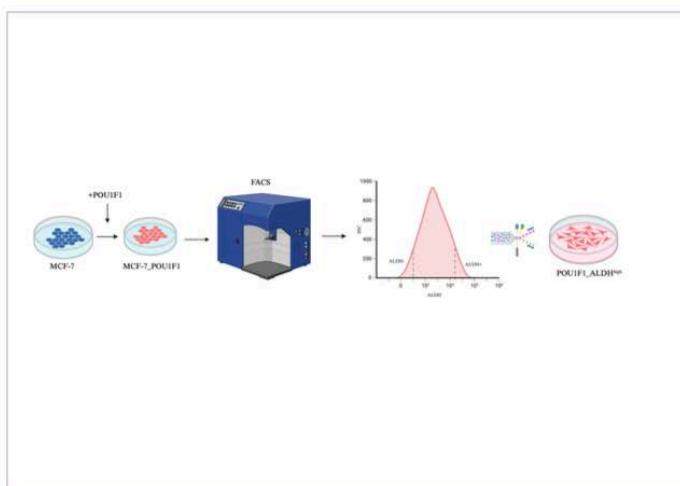


Figura 16A.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

September 27th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: HY27CW1LHG
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2021) [BioRender.com/h88p334](https://www.biorender.com/h88p334)

To whom this may concern,

This document is to confirm that [Leandro Avila](#) has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2021) [BioRender.com/h88p334](https://www.biorender.com/h88p334)".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.

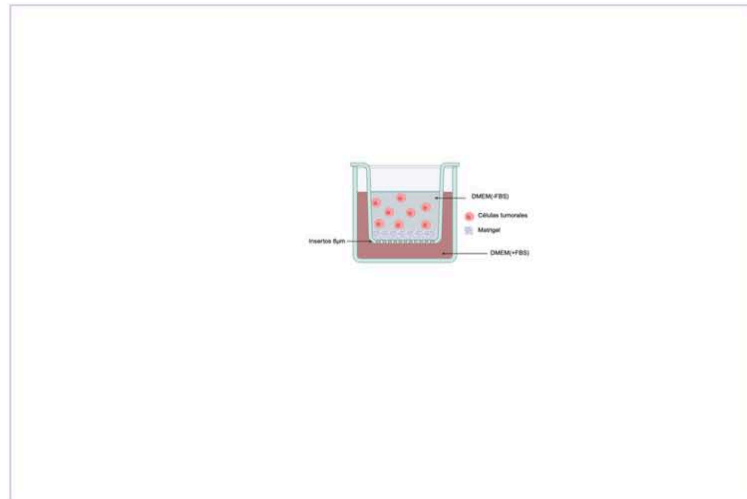


Figura 21A.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

October 14th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: KD27FBCKN1
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/z54i724](https://www.biorender.com/z54i724)

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/z54i724](https://www.biorender.com/z54i724)".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.

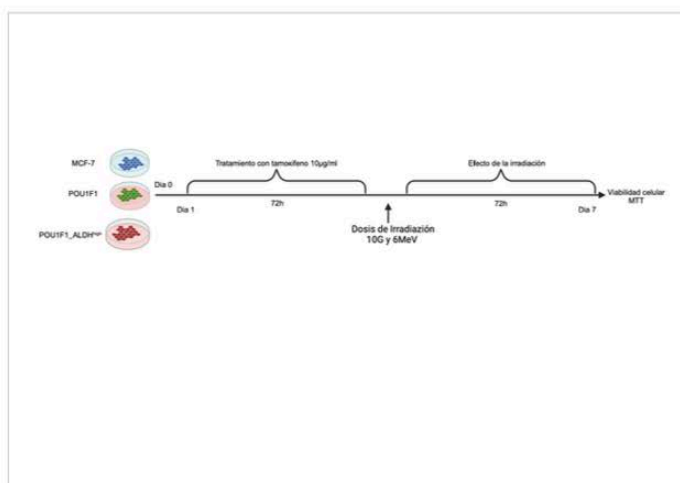


Figura 22.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

October 14th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: YL27FBCSLU
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/i82x352](https://www.biorender.com/i82x352)

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) [BioRender.com/i82x352](https://www.biorender.com/i82x352)".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.

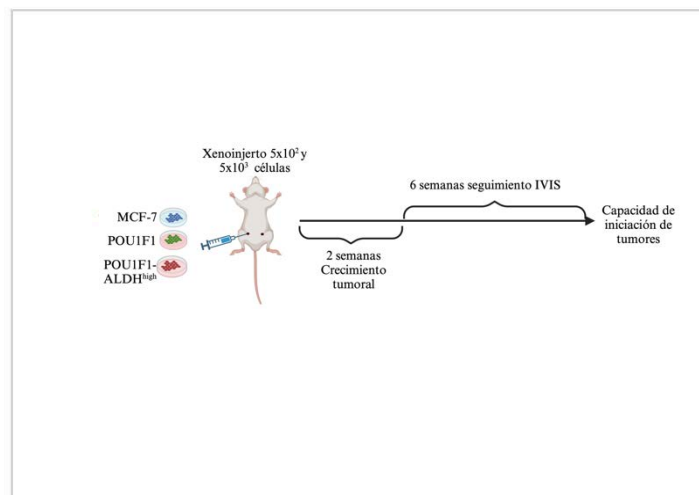


Figura 26



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

December 5th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: YN27MQ0M3F
Publisher Name: University Santiago de Compostela

Citation to Use: [Created in BioRender. Avila, L. \(2024\) https://BioRender.com/n151621](https://BioRender.com/n151621)

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) <https://BioRender.com/n151621>".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



Figura 29.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

November 18th, 2024

Subscription Type: Student Plan - Academic
Agreement number: MD27KBKP3L
Publisher Name: University Santiago de Compostela

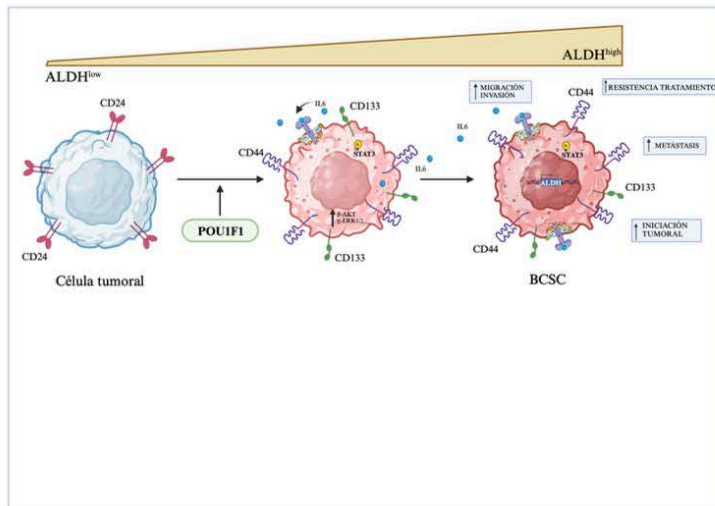
Citation to Use: Created in BioRender. Avila, L. (2024) <https://BioRender.com/p88o072>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Leandro Avila has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Avila, L. (2024) <https://BioRender.com/p88o072>".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.





El factor de transcripción POU1F1, conocido por regular hormonas hipofisarias, también influye en procesos tumorales como la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y la reprogramación metabólica. Este estudio analiza su papel en la plasticidad celular en cáncer de mama, evidenciando que POU1F1 promueve un fenotipo característico de células troncales tumorales mamarias (BCSCs), definido por CD24-/low/CD44+/high y alta actividad de ALDH. Estas BCSC-like presentan mayor capacidad migratoria, invasiva, de formación de colonias y mamosferas, así como mayor capacidad de iniciación tumoral en modelos in vivo, y mayor resistencia a tratamientos convencionales. Finalmente, se identificó una conexión entre POU1F1, la vía de señalización IL-6/JAK/STAT3, sugiriendo que esta regulación podría ser una posible diana terapéutica.