

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



La pérdida de muscleblind-like 1 (MBNL1) promueve un fenotipo mesenquimal y de célula madre tumoral en cáncer de mama triple negativo

TRABAJO FIN DE MÁSTER BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

CURSO ACADÉMICO 2019-2021

ALBA SÁNCHEZ JIMÉNEZ

Tutor UPV: Eloísa Jantus Lewintre

Tutores externos: Andrés Cervantes Ruy Pérez y Juan Miguel Cejalvo Andújar

Tutor experimental: Anna Adam Artigues

Valencia | Junio 2021

ABSTRACT

Triple negative breast cancer represents about 15% of breast cancer cases and this type of breast cancer is characterized by its aggressiveness and higher metastatic potential, therefore it is associated with a poor prognosis. In addition, due to the absence of therapeutic targets, chemotherapy is the only currently available treatment option.

In this project we evaluated the role of MBNL1 in the regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and the acquisition of stem cell properties in triple-negative breast cancer cell lines. The results demonstrated that loss of MBNL1 function causes a decrease in proliferation and CCNE2 expression, while induces an increased migration, invasion and colony formation capacity, as well as a lower expression of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell markers. In addition, the prognostic value of MBNL1 in triple-negative breast cancer patients was validated.

From these results we conclude that MBNL1 plays a role in the regulation of mesenchymal and cancer stem cell phenotype in triple-negative breast cancer *in vitro* and has a promising prognostic potential in breast cancer patients.

KEY WORDS: triple negative breast cancer, MBNL1, metastasis, epithelial to mesenchymal transition, mesenchymal phenotype, stem cell, aggressivity, prognostic.

Author: Alba Sánchez Jiménez

Location and date: Valencia, junio de 2021

Academic tutor: Eloísa Jantus Lewintre

Institution tutors: Andrés Cervantes Ruipérez y Juan Miguel Cejalvo Andújar

Experimental tutor: Anna Adam Artigues

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. Introducción..... | 5 |
| 1.1. Cáncer de mama..... | 5 |
| 1.1.1. Epidemiología..... | 5 |
| 1.1.2. Factores de riesgo..... | 6 |
| 1.1.3. Diagnóstico y estadificación del cáncer de mama..... | 7 |
| 1.1.4. Subtipos de cáncer de mama y pronóstico | 9 |
| 1.2. Cáncer de mama triple negativo..... | 12 |
| 1.2.1. Transición epitelio-mesenquimal y células madre de cáncer de mama en el desarrollo de metástasis | 12 |
| 1.2.1.1. Transición epitelio-mesenquimal..... | 13 |
| 1.2.1.2. Células madre de cáncer de mama | 15 |
| 1.3. Papel de MBNL1 en cáncer..... | 17 |
| 2. Hipótesis y objetivos..... | 19 |
| 3. Materiales y métodos | 20 |
| 3.1. Cultivos celulares | 20 |
| 3.2. Contaje de células..... | 21 |
| 3.3. Purificación de ADN plasmídico de interés a partir de bacterias | 22 |
| 3.4. Silenciamiento y sobreexpresión de MBNL1 en líneas celulares | 24 |
| 3.5. Ensayo de proliferación | 25 |
| 3.6. Ensayo de migración e invasión celular | 26 |
| 3.7. Ensayo de formación de colonias | 28 |
| 3.8. Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc..... | 28 |
| 3.9. PCR cuantitativa a tiempo real | 30 |
| 3.10. Extracción de proteínas y análisis por Western Blot..... | 32 |
| 3.11. Análisis de expresión de MBNL1 en bases de datos públicas | 34 |

| | |
|--|----|
| 3.12. Análisis estadístico..... | 35 |
| 4. Resultados | 36 |
| 4.1. Estudio de las características de la línea celular MDA-MB-231R en comparación con MDA-MB-231 | 36 |
| 4.1.1. Estudio de la proliferación celular | 36 |
| 4.1.2. Estudio de la transición epitelio-mesenquimal | 37 |
| 4.1.3. Estudio de las propiedades de célula madre cancerosa | 38 |
| 4.1.4. Análisis de expresión de MBNL1 | 39 |
| 4.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MDA-MB-231R | 40 |
| 4.2.1. Análisis de la eficacia de silenciamiento y sobreexpresión de MBNL141 | |
| 4.2.2. Estudio del efecto de MBNL1 sobre la proliferación celular | 43 |
| 4.2.3. Estudio del efecto de MBNL1 sobre la transición epitelio-mesenquimal | 45 |
| 4.2.4. Estudio del efecto de MBNL1 sobre las propiedades de célula madre cancerosa..... | 47 |
| 4.3. Correlación entre la expresión de <i>MBNL1</i> y la supervivencia libre de metástasis en pacientes de cáncer de mama triple negativo..... | 50 |
| 5. Discusión | 51 |
| 6. Conclusiones..... | 55 |
| 7. Referencias bibliográficas | 56 |

| ABREVIATURAS | |
|---------------------|---|
| ADNc | ADN complementario |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| ALDH1 | Aldehído deshidrogenasa 1 |
| ARNm | ARN mensajero |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BCSC | Célula madre cancerosa de cáncer de mama (<i>breast cancer stem cell</i>) |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CCNE2 | Ciclina E2 |
| CDH1 | E-Cadherina |
| CMTN | Cáncer de mama triple negativo |
| CSC | Célula madre cancerosa (<i>cancer stem cell</i>) |
| CT | Ciclo umbral (threshold cycle) |
| CTNNB1 | Beta-Catenina |
| DMFS | Supervivencia libre de metástasis (<i>Distant metastasis-free survival</i>) |
| ECM | Matriz extracelular (<i>extracellular matrix</i>) |
| EMT | Transición epitelio-mesenquimal (<i>epithelial-mesenchymal transition</i>) |
| EMT-TF | Factor de transcripción inductor de EMT (<i>EMT transcription factor</i>) |
| FN1 | Fibronectina |
| GLOBOCAN | <i>Global Cancer Observatory</i> |
| HER2 | Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>) |
| IHC | Inmunohistoquímica |
| MBNL1 | <i>Muscleblind-like 1</i> |
| MET | Transición mesenquimal-epitelial (<i>epithelial-mesenchymal transition</i>) |
| NST | Sin tipo especial (<i>Nonspecial type</i>) |
| RBP | Proteínas de unión a ARN (<i>RNA binding protein</i>) |
| RE | Receptor de estrógeno |
| RP | Receptor de progesterona |
| RT-qPCR | PCR cuantitativa a tiempo real (<i>real time quantitative PCR</i>) |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| siRNA | RNA pequeño de interferencia (<i>small interference RNA</i>) |
| TBS | Solución salina tamponada con Tris (<i>Tris-buffered saline</i>) |
| UICC | <i>Union for International Cancer Control</i> |
| VIM | Vimentina |
| CDH2 | N-Cadherina |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en el tejido glandular de la mama, generalmente en las células epiteliales de los conductos (85%) o lobulillos (15%). Inicialmente, el tumor se encuentra localizado en el conducto o lobulillo (*in situ*) y muestra un potencial mínimo de diseminación (metástasis). Con el tiempo, estos cánceres *in situ* (estadio 0) pueden progresar e invadir el tejido mamario circundante (cáncer de mama invasivo) y luego diseminarse a los ganglios linfáticos cercanos (metástasis regional) o a otros órganos del cuerpo (metástasis a distancia). La muerte por cáncer de mama se debe a una metástasis generalizada (World Health Organization, 2021).

1.1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es una de las enfermedades más comunes en el mundo y ocurre tanto en mujeres como en hombres, aunque el cáncer de mama masculino es extremadamente raro y representa alrededor del 1% de los casos (Harbeck *et al.*, 2019). Según la base de datos *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), en 2020 el cáncer de mama superaría al cáncer de pulmón como la neoplasia más diagnosticada, con una estimación de 2.3 millones de casos nuevos, lo que representa el 11.7% de todos los casos de cáncer (Sung *et al.*, 2021). Además, es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres (1 de cada 6 muertes por cáncer) y la quinta causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con 685000 muertes en el año 2020.

La incidencia demográfica de este tipo de cáncer varía mucho entre diferentes regiones geográficas, siendo cerca de un 90% superior en países desarrollados en comparación con países en desarrollo. Esto debe su explicación a que en los países con mayores ingresos hay un incremento de factores de riesgo, lo que aumenta los casos de cáncer de mama, así como una mayor disponibilidad y uso de la mamografía, lo que aumenta su detección. Además, en los países de ingresos altos, el cáncer de mama a menudo se diagnostica en una etapa temprana, lo que se asocia con un mejor pronóstico. Sin embargo, en los países de menores ingresos, como África Subsahariana y los países asiáticos en desarrollo, la mortalidad por cáncer de mama suele ser mayor a pesar de

su menor incidencia, debido al diagnóstico en etapas avanzadas y al acceso limitado al tratamiento. (Harbeck *et al.*, 2019; Sung *et al.*, 2021)

A pesar de que la prevalencia del cáncer de mama está aumentando en los últimos años, en la mayoría de los países occidentales la tasa de mortalidad ha disminuido debido a la mejora del tratamiento y la detección más temprana (Senkus *et al.*, 2015).

1.1.2. Factores de riesgo

Aproximadamente la mitad de los cánceres de mama se desarrollan en mujeres que no tienen ningún factor de riesgo identificable además del sexo (mujer) y la edad (mayores de 50 años). De este modo, la edad avanzada es un factor de riesgo importante que se ve reflejado en las cifras de incidencia antes de los 50 años (una cuarta parte) y antes de los 35 años (menos de un 5%) (Senkus *et al.*, 2015; World Health Organization, 2021). En España, la mayor incidencia de cáncer de mama tiene lugar a partir de los 75 años según cifras estimadas de la base de datos GLOBOCAN (**Figura 1**).

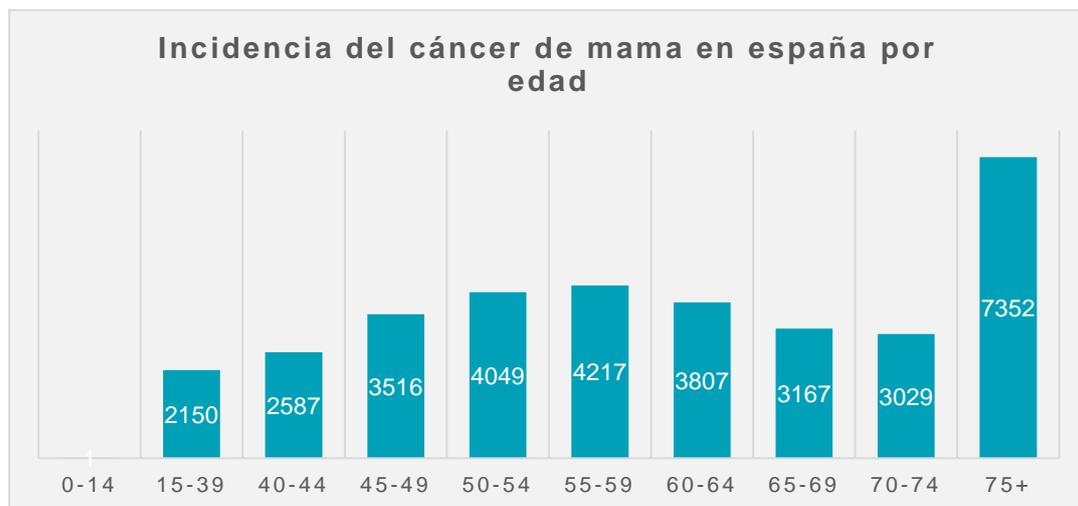


Figura 1. Edad como factor de riesgo en cáncer de mama. Se muestra el número de nuevos casos en los diferentes rangos de edad estimados para el año 2020 en España. *Fuente:* GLOBOCAN, 2020.

No obstante, existen diversos factores que favorecen la aparición de cáncer de mama, como los relacionados con el estilo de vida, los factores de riesgo reproductivos y hormonales, y la predisposición genética.

Entre los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida destacan la obesidad, la inactividad física y el consumo de alcohol. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los cánceres de mama en todo el mundo pueden atribuirse a estos factores de riesgo modificables, lo que ofrece la posibilidad de reducir la incidencia de la enfermedad al promover un estilo de vida saludable (Harbeck *et al.*, 2019).

Los factores de riesgo reproductivos y hormonales incluyen la menarquia temprana, la edad avanzada en el primer parto, falta de lactancia materna, menor número de hijos y menopausia de aparición tardía. Se han ofrecido varias explicaciones sobre por qué el embarazo temprano y los altos niveles de estrógeno durante el embarazo reducen el riesgo de cáncer de mama. Los mecanismos propuestos incluyen la alteración de la sensibilidad de la glándula mamaria a exposiciones hormonales posteriores; reducción del número de células madre o progenitoras y, en consecuencia, eliminación de dianas de transformación maligna; y cambios en los patrones de expresión génica que dan como resultado una menor proliferación y una mayor diferenciación (Harbeck *et al.*, 2019; Sung *et al.*, 2021).

Por último, la herencia de mutaciones genéticas de “alta penetrancia” aumentan en gran medida el riesgo de cáncer de mama, siendo las más dominantes las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, cuyas proteínas están involucradas en la reparación del ADN y muestran una herencia autosómica dominante. La secuenciación de siguiente generación o NGS, por sus siglas en inglés, ha permitido analizar paneles de genes para determinar el riesgo de cáncer de mama heredado y se han incluido, además de *BRCA1* y *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11* y *TP53*. Así, las mujeres que tengan mutaciones en estos genes podrían considerar estrategias de reducción del riesgo, como la extirpación quirúrgica de ambos senos (Harbeck *et al.*, 2019; World Health Organization, 2021).

1.1.3. Diagnóstico y estadificación del cáncer de mama

El diagnóstico del cáncer de mama en una fase temprana implica un mayor abanico de posibles tratamientos eficaces y, con ello, un mejor pronóstico. Por esta razón, los programas de cribado poblacional mediante mamografía han demostrado reducir significativamente la mortalidad por cáncer de mama en un riesgo relativo del 20% (Independent UK Panel on Breast Cancer Screening, 2012).

El diagnóstico del cáncer de mama una vez detectada cualquier anomalía, se basa en una prueba triple que consiste en un examen clínico, imagenología (generalmente mamografía y/o ecografía) y biopsia de tejido (Harbeck *et al.*, 2019). El examen clínico incluye la palpación de las mamas y los ganglios linfáticos locorregionales y la evaluación de metástasis a distancia (huesos, hígado y pulmones). Las técnicas de imagen más empleadas son la mamografía bilateral y ecografía (Senkus *et al.*, 2015). La resonancia magnética puede emplearse en situaciones clínicas específicas, como cuando existen grandes discrepancias entre examen clínico e imagenología o en mujeres con metástasis en los ganglios axilares pero sin tumor mamario detectable (oculto) (Senkus *et al.*, 2015; Harbeck *et al.*, 2019).

La extensión del cáncer y su diseminación en el momento del diagnóstico determina su estadio, que es esencial para orientar las opciones de tratamiento, así como para evaluar el pronóstico (American Cancer Society, 2019). El sistema más utilizado para la estadificación del carcinoma de mama es el sistema TNM publicado por el AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la UICC (Union for International Cancer Control). Este sistema proporciona información sobre la extensión del cáncer en el sitio primario (tumor o T), en los ganglios linfáticos regionales (ganglios o N) y la diseminación a sitios metastásicos distantes (metástasis o M). T, N y M se combinan para crear cinco estadios (estadios 0-IV) que resumen la información sobre la extensión de la enfermedad regional (tamaño del tumor, invasión de la piel o de la pared torácica y compromiso ganglionar) y metástasis a sitios distantes (**tabla 1**) (Harbeck *et al.*, 2019). La supervivencia relativa a 5 años se sitúa en torno al 100% para las pacientes con cáncer de mama que se diagnostican en estadio I (44% de casos de cáncer de mama), pero disminuye al 26% para las que tienen un diagnóstico en estadio IV (5% de los casos) (Miller *et al.*, 2019).

| ESTADIO TNM | T (tumor) | N (ganglios) | M (metástasis) | Descripción del diagnóstico |
|------------------------|------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| Estadio 0 | Tis | N0 | M0 | Carcinoma de mama <i>in situ</i> . Se observan células anormales, pero no se han diseminado al tejido cercano. Se considera cáncer benigno, pero puede evolucionar hacia una neoplasia maligna. |
| Estadio IA | T1 | N0 | M0 | Cáncer de mama local/regional. A mayor número de T, N y M, mayor es el tamaño del tumor primario, número de ganglios linfáticos afectados y mayor progresión metastásica presenta, respectivamente. |
| Estadio IB | T0, T1 | N1mi | | |
| Estadio IIA | T0, T1 | N1 | M0 | |
| | T2 | N0 | | |
| Estadio IIB | T2 | N1 | | |
| | T3 | N0 | | |
| Estadio IIIA | T0, T1, T2 | N2 | M0 | |
| | T3 | N1, N2 | | |
| Estadio IIIB | T4 | N0, N1, N2 | | |
| Estadio IIIC | Cualquier T | N3 | | |
| Estadio IV | Cualquier T | Cualquier N | | M1 |

Tabla 1. Estadios de cáncer de mama basados en el sistemas TNM. Tis: tumor *in situ*; Nmi: micrometástasis (pequeñas áreas de diseminación) en los ganglios linfáticos debajo del brazo. Fuente: (Giuliano et al., 2017; National Cancer Institute, 2015).

1.1.4. Subtipos de cáncer de mama y pronóstico

Aunque históricamente el cáncer de mama se ha considerado como una enfermedad única, actualmente se considera como un grupo heterogéneo de enfermedades con varias clasificaciones que las dividen en dos tipos principales (*in situ* e invasivo), en cuatro subtipos intrínsecos basados en los marcadores inmunohistoquímicos tradicionales, en 5 subtipos moleculares y en, al menos, 21 subtipos histológicos distintos (Eroles et al., 2012; American Cancer Society, 2019).

Clasificación histológica. Se basa en el tamaño, la forma y la disposición de las células del cáncer de mama. Esta clasificación diferencia entre carcinomas invasivos “sin tipo especial” (NST, por sus siglas en inglés) antes llamados carcinomas ductales (70-75%),

carcinomas lobulillares (10-14%) y el resto son tumores de tipo especial. La mayoría de tipos especiales sin histología mixta o <10% de otro subtipo tienen un pronóstico muy bueno (Harbeck *et al.*, 2019; *American Cancer Society*, 2019).

Clasificación inmunohistoquímica. Se diferencian 4 subtipos (Luminal A, luminal B, triple negativo y HER2) en función del marcaje inmunohistoquímico (IHC, por sus siglas en inglés) de biomarcadores específicos: el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y el marcador de proliferación Ki67, de forma que los tumores que expresan RE y/o RP se denominan "receptores hormonales positivos" (HR⁺, por sus siglas en inglés), mientras que los tumores que no expresan RE, RP y HER2 se denominan "triples negativos" (o HR⁻) (Harbeck *et al.*, 2019; *American Cancer Society*, 2019).

Luminal A (HR⁺/HER2⁻): es el más común y tiende a ser de crecimiento más lento y menos agresivo que otros subtipos. Los tumores luminales A se asocian con el pronóstico más favorable (baja tasa de recaída y supervivencia más prolongada desde la recaída), en parte porque suelen responder a la terapia hormonal (Eroles *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2019).

Luminal B (RE⁺/HER2⁺): tienen un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico e índice proliferativo y peor pronóstico (presentan menor tiempo de supervivencia tras la recaída). También pueden ser HER2⁻, por lo que la principal forma de distinguirlos del subtipo luminal A es a través de la elevada expresión del marcador de proliferación Ki67. (Eroles *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2019).

HER2 (HR⁻/HER2⁺): incluyen aquellos tumores con sobreexpresión de HER2. Tienen un alto grado histológico y, en el pasado, este subtipo tenía el peor pronóstico; sin embargo, el uso generalizado de terapias dirigidas a HER2 ha mejorado mucho los resultados en estas pacientes (Senkus *et al.*, 2015; *American Cancer Society*, 2019).

Triple negativo (HR⁻/HER2⁻): son RE⁻, RP⁻ y HER2⁻ y tienen un pronóstico más desfavorable que otros subtipos debido a su mayor agresividad y probabilidad de recaídas metastásicas a corto plazo (~3 primeros años). Además, no pueden beneficiarse de las terapias dirigidas a los receptores específicos, por lo que solamente cuentan con tratamientos basados en quimioterapia (Eroles *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2019).

Clasificación molecular. Los subtipos moleculares o intrínsecos de cáncer de mama (luminal A, luminal B, *normal-like*, *basal-like* y *HER2-enriched*) fueron descritos en el año 2000 por Perou y Sorlie (Perou *et al.*, 2000) basándose en una firma de expresión de 50 genes (PAM50) analizados mediante el uso de *microarrays*. Sin embargo, el análisis de expresión génica aún es un proceso costoso y complejo que actualmente no se suele llevar a cabo en la práctica clínica, por lo que se utiliza la clasificación anterior.

Luminal A y luminal B: se caracterizan por la expresión de genes activados por el factor de transcripción RE, que normalmente se expresan en el epitelio luminal que recubre los conductos mamarios. Se diferencian entre sí porque el subtipo luminal B tiene una expresión mucho mayor de genes relacionados con la proliferación celular (Ki67) y un alto grado histológico, en comparación con una muy baja expresión de Ki67 y bajo grado histológico del subtipo luminal A (Eroles *et al.*, 2012).

HER2-enriched: incluyen aquellos tumores con sobreexpresión de HER2 y genes asociados a su vía de señalización. También exhiben una sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular y más del 40% tienen mutaciones en *P53*. El perfil IHC no se corresponde perfectamente con el subtipo intrínseco, ya que sólo el 70% de los tumores de HER2⁺ identificados por *microarrays* presentan la proteína sobreexpresada por IHC (Eroles *et al.*, 2012).

Basal-like: llamados así porque expresan genes normalmente presentes en células mioepiteliales mamarias normales, aunque también expresan genes característicos del epitelio luminal, pero a niveles significativamente más bajos que los de los carcinomas luminales. La mayoría (alrededor del 75%) de los cánceres de mama triple negativos (CMTN) pertenecen al subtipo *basal-like* definido por su perfil de expresión génica (Eroles *et al.*, 2012; *American Cancer Society*, 2019).

Normal-like: expresan genes característicos del tejido adiposo y carecen de la expresión de ER, HER2 y PGR, por lo que estos tumores también se pueden clasificar como triple negativos sin ser considerados basales, ya que son negativos para genes mioepiteliales. La importancia clínica de estos tumores aún no se ha determinado y existen dudas sobre su existencia real, ya que algunos investigadores creen que podrían ser un artefacto técnico de alta contaminación con tejido normal en los *microarrays* (Eroles *et al.*, 2012).

1.2. Cáncer de mama triple negativo

El CMTN representa en torno al 15% del total de cánceres de mama y, como se ha introducido anteriormente, define aquellos tumores que no expresan ninguno de los biomarcadores específicos (RE, RP ni HER2). Por esta razón, los pacientes de CMTN no pueden beneficiarse de terapias dirigidas a dichos marcadores, quedando la quimioterapia como principal opción de tratamiento para estadios tanto iniciales como avanzados de la enfermedad (Bianchini *et al.*, 2016; Harbeck *et al.*, 2019). Los principales agentes quimioterápicos utilizados para el tratamiento del CMTN son antraciclinas, principalmente doxorrubicina, junto con taxanos, como docetaxel o paclitaxel y también se pueden combinar con agentes de platino (Yao *et al.*, 2017; Harbeck *et al.*, 2019).

Las limitaciones en el tratamiento, junto con una mayor agresividad y capacidad de invasión hacia otros tejidos, hace que los pacientes con CMTN tengan un peor pronóstico comparado con otros subtipos (Bianchini *et al.*, 2016; Harbeck *et al.*, 2019). Sin embargo, a pesar de su pronóstico desfavorable, muchos CMTN son muy sensibles a la quimioterapia y tienen una mayor tasa de respuesta en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. Este fenómeno se conoce comúnmente como la *paradoja triple negativa*, en la que los tumores tienen un pronóstico general desfavorable y una alta probabilidad de beneficiarse del tratamiento con quimioterapia al mismo tiempo. A pesar de todo, la aparición muy rápida de metástasis y el mal pronóstico del subconjunto de CMTN que no responde a la quimioterapia hacen que las cifras generales de supervivencia sean tan bajas: menos del 30% de las mujeres con cáncer de mama metastásico sobreviven 5 años después del diagnóstico, y prácticamente todas las mujeres con TNBC metastásico morirán finalmente a causa de la enfermedad (Carey *et al.*, 2007; Bianchini *et al.*, 2016; Denkert *et al.*, 2017).

1.2.1. Transición epitelio-mesenquimal y células madre de cáncer de mama en el desarrollo de metástasis

La principal causa de muerte en pacientes de CMTN, como hemos mencionado, es el desarrollo de metástasis, cuya progresión podríamos resumir de la siguiente forma: (1) transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) de células tumorales; (2) intravasación de células tumorales en el sistema circulatorio; (3) migración celular a sitios distantes; (4) extravasación de células tumorales para iniciar nuevos focos; y (5)

desarrollo de tumores secundarios metastásicos (Martin *et al.*, 2013; Mendoza-Almanza *et al.*, 2020) (**figura 2**). En concreto, las células de cáncer de mama presentan tropismo hacia la diseminación en hueso, pulmón, hígado y cerebro, además de los ganglios linfáticos. A pesar de que el hueso es el lugar metastásico más afectado y el cerebro el sitio menos afectado, la mediana de supervivencia de los pacientes con cáncer de mama varía de 36 a 8 meses, dependiendo de la presencia de metástasis óseas o cerebrales, respectivamente (Riggio *et al.*, 2021).

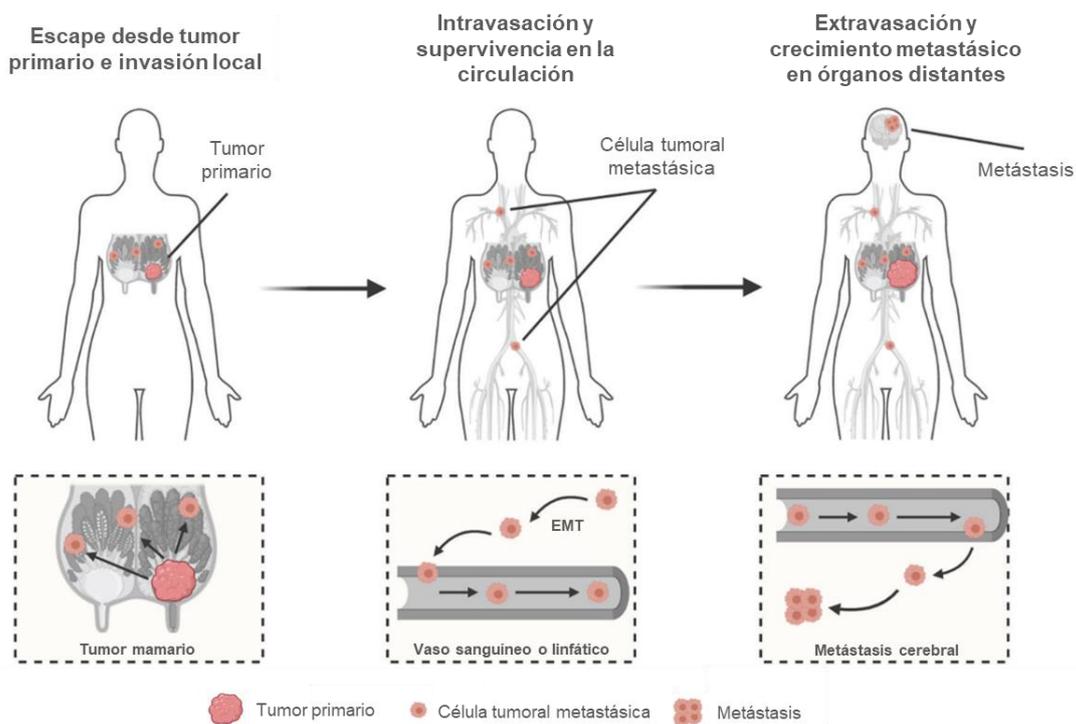


Figura 2. Representación de la progresión metastásica en cáncer de mama. Figura adaptada a partir de (Riggio *et al.*, 2021). EMT: transición epitelio-mesénquima.

1.2.1.1. Transición epitelio-mesénquima

La EMT tiene un papel esencial en la embriogénesis, la cicatrización de heridas y la progresión tumoral (Dongre and Weinberg, 2019). Se trata de un programa celular reversible en el que las células cambian transitoriamente su morfología y funcionalidad. Normalmente, las células que forman láminas epiteliales en varios tejidos del cuerpo muestran polaridad apical-basal y se mantienen juntas lateralmente por uniones estrechas, desmosomas y uniones adherentes, estas últimas formadas por moléculas

de cadherina epitelial de la superficie celular (E-cadherina). Además, están unidas a la membrana basal (matriz extracelular especializada) subyacente mediante hemidesmosomas (**figura 3**). Esta organización es crucial para mantener la integridad estructural de los epitelios. Tras la activación de EMT, se reprime la expresión de E-cadherina, lo que conduce a la pérdida de la morfología típica cuboidal de las células epiteliales. Las células adquieren una morfología fusiforme y expresan marcadores asociados a las células mesenquimales, en particular cadherina neural (N-cadherina), vimentina y fibronectina (Wu *et al.*, 2016; Shibue and Weinberg, 2017; Dongre and Weinberg, 2019).

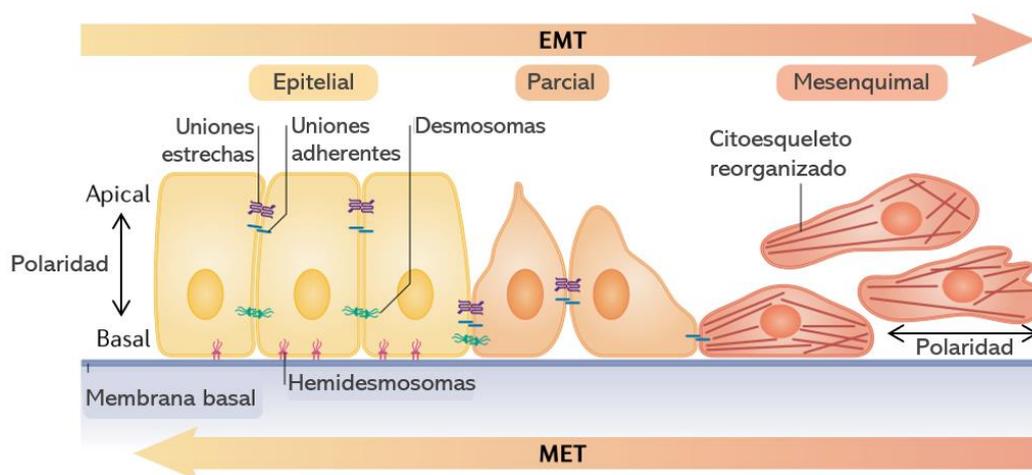


Figura 3. Transición epitelio-mesenquimal. La EMT es un proceso reversible en el que se producen alteraciones en la polaridad, disposición del citoesqueleto y en las interacciones célula-célula y célula-membrana basal que dotan al fenotipo mesenquimal de una mayor movilidad. Imagen adaptada de (Dongre and Weinberg, 2019). EMT: transición epitelial-mesenquimal; MET: transición mesenquimal-epitelial.

La EMT está dirigida por factores de transcripción inductores de EMT (EMT-TF), como ZEB, SNAIL y TWIST, que actúan pleiotrópicamente y en diversas combinaciones para inducir la expresión de genes que promueven el fenotipo mesenquimal a la vez que reprimen la expresión de genes que mantienen el fenotipo epitelial (Dongre and Weinberg, 2019). Estos cambios en la expresión génica dan como resultado cambios celulares (**figura 3**) que incluyen la ruptura de las uniones entre células epiteliales, la pérdida de la polaridad apical-basal y la degradación de la membrana basal y reorganización de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Esta pérdida progresiva de características epiteliales va acompañada de la adquisición parcial de características mesenquimales, como polaridad delantera-trasera, citoesqueleto

reorganizado y expresión de un conjunto distinto de moléculas y EMT-TF. Así, durante la EMT, las células se vuelven móviles y adquieren capacidad de invasión, facilitando su diseminación metastásica. Posteriormente, las células más mesenquimales resultantes pueden volver a un estado epitelial en el proceso inverso, conocido como transición mesenquimal-epitelial (MET) (Wu *et al.*, 2016; Shibue and Weinberg, 2017; Dongre and Weinberg, 2019).

Entre los EMT-TF más destacados, SNAIL reprime el gen que codifica la cadherina E (*CDH1*) uniéndose a las cajas E en el promotor *CDH1* y reclutando el complejo represivo polycomb. De manera similar, ZEB1 reprime transcripcionalmente *CDH1* e induce la expresión de los genes que codifican vimentina y N-cadherina mediante el reclutamiento de otros modificadores de cromatina a sus promotores. SNAIL y ZEB1 también reprimen transcripcionalmente la expresión de scrumbs (una proteína transmembrana), PATJ (una proteína de andamiaje) y LGL (una proteína citoesquelética), todas las cuales son importantes para regular la formación de uniones intercelulares y la polaridad apical-basal. Además, SNAIL y ZEB2 activan la expresión de metaloproteinasas de matriz que facilitan la degradación de la membrana basal, promoviendo la invasión celular (Dongre and Weinberg, 2019).

1.2.1.2. Células madre de cáncer de mama

Se ha introducido anteriormente la gran heterogeneidad intertumoral del cáncer de mama, manifestada por su clasificación en varios subtipos con diferente firma de expresión molecular. Además de esta heterogeneidad intertumoral, las propias células tumorales también son muy heterogéneas, ya que no todas tienen la misma capacidad de autorrenovarse, iniciar metástasis y resistir a los tratamientos. (Guo, 2014; Luo *et al.*, 2015).

Esta heterogeneidad intratumoral se ha explicado a través de dos modelos. El primero es el *modelo de evolución clonal*, que postula que durante la progresión del tumor, ciertos subclones de células cancerosas adquieren aleatoriamente mutaciones somáticas o cambios epigenéticos que les confieren características específicas para iniciar y propagar el tumor. El segundo, y el más aceptado, es el *modelo jerárquico*, también llamado *modelo de células madre cancerosas* o *de células iniciadoras de tumor*, que propone que los tumores poseen una pequeña fracción (<1% en tumores sólidos) de células tumorales con capacidades mejoradas de autorrenovación y de regenerar tumores fenotípicamente heterogéneos, conocidas como células madre cancerosas

(CSCs, por sus siglas en inglés), mientras que la mayor parte de la masa tumoral estaría formada por células cancerosas diferenciadas con una baja o nula tumorigenicidad (Guo, 2014; Luo *et al.*, 2015; Clara *et al.*, 2020). Esta capacidad de autorrenovación de las CSCs les confiere una ventaja de supervivencia, ya que reparan de manera eficiente el daño del ADN, mientras que la capacidad de diferenciación les proporciona potencial tumorigénico (Bai *et al.*, 2018). Recíprocamente, también se ha observado que las células tumorales diferenciadas se desdiferencian en CSCs, destacando así la plasticidad bidireccional entre estas dos poblaciones (Bai *et al.*, 2018; Dongre and Weinberg, 2019).

Las células madre de cáncer de mama (BCSCs, por sus siglas en inglés) se identificaron y aislaron por primera vez en el año 2003 gracias a la expresión de los marcadores de superficie CD44⁺ CD24^{-/bajo} y a la ausencia de marcadores de linaje en esta subpoblación celular del tumor (Al-Hajj *et al.*, 2003). En los siguientes años, estos marcadores se detectaron en células de cáncer de mama circulantes periféricas y en la médula ósea de pacientes con diseminación temprana. Además, tras los tratamientos convencionales que destruyen las células cancerosas de alta proliferación, las CSCs conservan la autorrenovación y contribuyen al riesgo de recurrencia tumoral. Así, numerosos estudios posteriores han llevado a la asociación de las BCSCs con una mayor probabilidad de recurrencia y metástasis. (Bai *et al.*, 2018)

En los últimos años, se han identificado marcadores adicionales para caracterizar las BCSC, como CD133, ABCG2, CD49f, LGR5, SSEA-3, CD70 y PROCR. Sin embargo, hasta la fecha, los biomarcadores más utilizados para la identificación del fenotipo de BCSC son CD44, CD24 y ALDH1. CD44 es una glicoproteína transmembrana de la superficie celular que participa en muchas funciones celulares, como la adhesión, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Además, CD44 es receptor específico del ácido hialurónico y osteopontina, componentes mayoritarios de tejidos como el hueso, cerebro, hígado y pulmón, donde favorecen el desarrollo de metástasis mediante el anclaje de las BCSC. CD24 es una sialoglicoproteína que, expresada en bajos niveles, mejora la adhesión celular, la proliferación y la metástasis de las BCSC, además de estar implicada en radio y quimiorresistencia. Por último, ALDH1 es la forma dominante en mamíferos de la familia de proteínas aldehído deshidrogenasa y es un marcador común en células madre mamarias normales y malignas. Esta enzima regula la diferenciación temprana de las células madre a través de la oxidación del retinol a ácido retinoico, que es vital para mantener el potencial diferenciado de las células madre

específicas de tejido. Así, una elevada expresión de ALDH1 se asocia con un mal pronóstico y baja supervivencia en CMTN (Bozorgi *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Además, las CSCs también expresan marcadores tradicionales de pluripotencia como los conocidos factores de Yamanaka, es decir, los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG (Najafi, 2018).

Se han sugerido diferentes hipótesis que relacionan las propiedades de CSCs con la EMT, pero la correlación entre ambos conceptos aún no está clara. Se han identificado BCSCs ALDH1⁺ con perfiles de expresión epitelial caracterizadas por una mayor capacidad proliferativa y una localización central en el tumor, así como BCSCs con marcadores CD44⁺/CD24^{-/low} de tipo mesenquimal que presentan mayor inactividad o quiescencia y se localizan en los márgenes más invasivos del tumor. De esta forma, las BCSC podrían transitar de manera reversible entre estos dos estados bajo la regulación de la señalización de citocinas experimentando programas de EMT / MET. (Luo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

1.3. Papel de MBNL1 en cáncer

Muscleblind-like (MBNL) hace referencia a una familia de proteínas de unión a ARN (RBP, por sus siglas en inglés) que regulan el empalme o *splicing* de sus pre-ARN mensajeros (pre-ARNm) diana en un proceso conocido como *splicing* alternativo. El *splicing* alternativo es un mecanismo que genera diversidad proteica, ya que permite generar numerosas isoformas de proteínas con distinta estructura de ARNm y distinta función. De esta forma, a través de su unión a regiones de transcritos específicos, las RBP regulan numerosos procesos, incluido el procesamiento de pre-ARNm, la estabilidad del ARN y la traducción, que finalmente modulan la expresión génica (Pascual *et al.*, 2006; Baralle and Giudice, 2017).

La familia MBNL está formada por 3 isoformas (MBNL1, MBNL2 y MBNL3) con un alto grado de homología entre ellas, pero distintos patrones de expresión y tejidos en los que se expresan (Pascual *et al.*, 2006). Entre ellos, MBNL1 es la isoforma mayoritaria en el tejido mamario y se une a sus pre-ARNm diana mediante dos pares de dominios de dedos de zinc muy conservados que reconocen YGCY (donde Y = C o U) y motivos similares para regular su *splicing* (Fish *et al.*, 2016; Voss *et al.*, 2021). Es importante destacar que los propios transcritos de *MBNL1* se someten a un corte y empalme alternativo, generando numerosas isoformas en las que la eliminación del exón 5,

altamente conservado, es esencial para la localización nuclear y la actividad de corte y empalme de la proteína MBNL1 (Gates *et al.*, 2011).

MBNL1 se ha descrito clínicamente en la patogénesis de la distrofia miotónica, una enfermedad genética en la que se produce una acumulación de transcritos aberrantes debido a que contienen expansiones de repeticiones de nucleótidos específicos. Así, se ha demostrado que estos transcritos aberrantes se unen y retienen a MBNL1, impidiendo que esta RBP regule la expresión de sus genes diana, entre ellos, genes implicados en la diferenciación muscular y en la diferenciación de células madre embrionarias. Debido a ello, la distrofia miotónica se caracteriza por una relajación muscular anormal, disfunción cardíaca y nerviosa, entre otras patologías (Kanadia *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2006; Thornton *et al.*, 2017).

Recientemente, se ha identificado a MBNL1 como un supresor robusto de metástasis en cáncer de mama (Fish *et al.*, 2016) y, durante los últimos años, ha aumentado el número de estudios que centran su atención en el papel de esta RBP en tumores sólidos. En dichos estudios, MBNL1 se ha visto significativamente infraexpresado en tejidos tumorales de pacientes con distintos tipos de cáncer, lo que se correlacionaba con la progresión metastásica, aumento de recaídas y peor prognosis (Fish *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Ray *et al.*, 2020; Voss *et al.*, 2021). Esto sugiere que MBNL1 podría estar implicado en la regulación de la aparición, deterioro y mala prognosis en cáncer, incluido el cáncer de mama.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio del papel de MBNL1 en la regulación del fenotipo mesenquimal y de célula madre tumoral en un modelo *in vitro* de CMTN.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha introducido anteriormente, existe evidencia científica de la relación entre MBNL1 y una peor prognosis en distintos tipos de cáncer. Por ello, la hipótesis en la que se basa este proyecto postula que MBNL1 podría estar implicado en la regulación del fenotipo mesenquimal y de CSC, a su vez asociados a la aparición y desarrollo de metástasis en CMTN.

El objetivo general de este trabajo es estudiar el papel de MBNL1 en la regulación del potencial metastásico en CMTN.

Para completar este objetivo general, los objetivos específicos que se plantean en este trabajo son:

1. Caracterizar la línea celular MDA-MB-231R como modelo más agresivo de CMTN en el contexto del desarrollo de metástasis mediante ensayos funcionales y de expresión de genes y proteínas.
2. Estudiar la expresión de MBNL1 en líneas de CMTN con distinto grado de agresividad.
3. Estudiar el efecto de la ganancia y pérdida de función de MBNL1 sobre el fenotipo mesenquimal y de CSC.
4. Estudiar la correlación entre la expresión de *MBNL1* en tumores primarios de pacientes de CMTN y la supervivencia libre de metástasis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Para este proyecto se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MDA-MB-231R de CMTN cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada.

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-436 son líneas celulares epiteliales de cáncer de mama humano que se establecieron a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 y 43 años respectivamente, con un adenocarcinoma mamario metastásico. La línea celular MDA-MB-231R es una línea con resistencia generada a doxorubicina mediante la adición de pequeñas cantidades de este quimioterápico a la línea MDA-MB-231 durante un tiempo prolongado y seleccionando aquellas células que sobrevivían y proliferaban. Esta línea resistente se utilizó en este proyecto como modelo de mayor agresividad de CMTN.

Los medios de cultivo empleados para cada línea celular se indican la **tabla 2**.

| | |
|--------------------|---|
| <i>MDA-MB-436</i> | DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement - Gibco™ |
| <i>MDA-MB-231</i> | DMEM/F12 - Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 |
| <i>MDA-MB-231R</i> | DMEM/F12 - Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 |

Tabla 2. Medios de cultivo empleados para cada línea celular.

El medio de cultivo recomendado en cada caso se suplementó con un 10% de suero bovino fetal (Thermo Fisher Scientific), un 1% de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml) (Thermo Fisher Scientific), y un 1% L-glutamina (200 mM) (Thermo Fisher Scientific). En el caso de la línea MDA-MB-436 el medio no se suplementó con glutamina.

El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, al alcanzar las células un ~90% de confluencia. Una vez alcanzada esta confluencia, las células se pasaron a frascos de cultivo de mayor tamaño o a un mayor número de ellos. Para realizar los pases, se retiró el medio de cultivo con alta proporción de productos de deshecho y pobre en nutrientes. Después, se lavaron las células con PBS para eliminar restos de suero contenidos en el medio celular, ya que este inactiva a la tripsina. A continuación, se añadió tripsina, una proteasa que digiere las proteínas celulares implicadas en adhesión celular, permitiendo

su actuación durante 3 minutos en el incubador a 37°C. Una vez se observaban las células despegadas de la superficie, se añadió su medio de cultivo recomendado suplementado para inactivar la tripsina tanto por la acción del suero como por la dilución de la misma. El medio con las células se recopiló en tubos cónicos tipo Falcon para su centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm. El volumen empleado, tanto de PBS como de tripsina y medio suplementado, fue de 2 ml para frascos pequeños de 25 ml y de 4 ml para frascos medianos de 75 ml. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio fresco que, por último, se añadió a 4 ml o 9 ml del mismo medio en frascos de 25 ml o 75 ml, respectivamente.

Las líneas celulares se mantuvieron en ultracongelación a -80°C. El medio de congelación utilizado fue DMSO al 10% en suero. El DMSO es un crioprotector que impide la formación de cristales durante la congelación celular. Las células de los frascos de 25 ml se congelaron en un vial de 1 ml, mientras que los frascos de 75 ml se pasaron a 3 viales. Para ello, las células se tripsinizaron y centrifugaron hasta obtener un pellet, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 900 µl de suero (volumen para un vial). Por último, se pasó a un vial para su conservación y se añadieron 100 µl de DMSO y se conservó en ultracongelación a -80°C.

Para su descongelación se pasaron a hielo para su transporte al incubador, donde se dejan unos minutos hasta quedar en estado líquido apto para su manipulación. Después, se añade el contenido del criovial a 5 ml de medio en un tubo tipo Falcon para su centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm. Por último, se retiró el sobrenadante (que contiene el medio de congelación) y se resuspendieron las células en 1 ml de medio fresco suplementado, que después se llevó hasta 5 ml con más medio en un frasco de 25 ml.

3.2. Contaje de células

Para la realización de los experimentos, las células se contaron y se sembraron en frascos de distintos volúmenes o placas de diferente número de pocillos según los requerimientos de cada ensayo. Para contar el número de células se utilizó la cámara de Neubauer, que se distribuye en dos partes simétricas de profundidad 0.1 mm, cada una de ellas con 4 cuadrantes de 1 mm² de superficie. En cada una de estas dos partes simétricas se añadieron ~10 µl del cultivo celular y se contó, utilizando un microscopio invertido y un contador manual, el número de células en los 4 cuadrantes (cuyo volumen

es de 0,1 mm³ o 10⁻⁴ ml). Se calculó la media del número de células contadas por cuadrante y se obtuvo la concentración (Nx10⁴ células/ml). De este modo, conociendo la concentración de células y el número final de células a sembrar, se calculó qué volumen del cultivo celular era necesario añadir en cada réplica para cada experimento.

3.3. Purificación de ADN plasmídico de interés a partir de bacterias

El plásmido que contiene el gen *MBNL1*, utilizado para su sobreexpresión en la línea celular MDA-MB-231R, fue PADNC3.1-MBNL1 (Addgene, 96906) (figura 4).

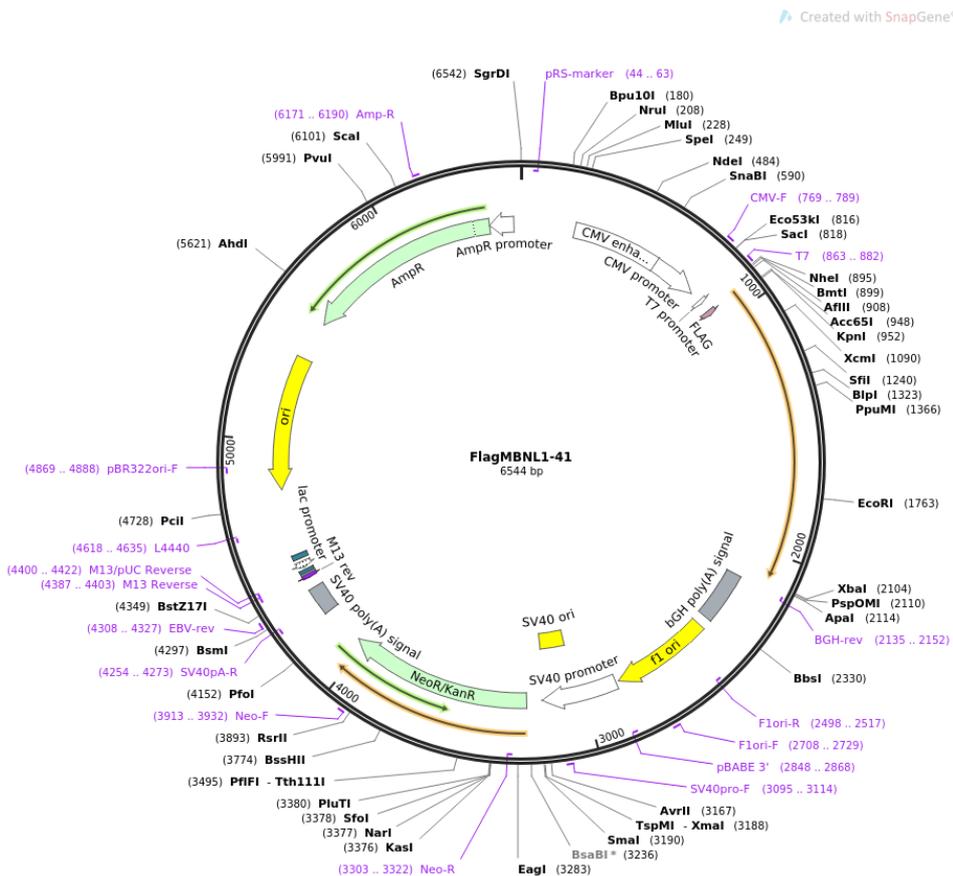


Figura 4. Mapa genético del plásmido pADNC3.1-MBNL1. Fuente: Addgene, 2021.

Este plásmido se adquirió en bacterias *E. Coli* DH5 α transformadas, que se sembraron en placas de agar para su crecimiento. Posteriormente, para contar con una mayor cantidad de plásmido en la extracción, se picó una colonia de bacterias con una punta

de pipeta y se introdujo en matraces con medio LB y antibiótico ampicilina a 100 µg/ml (marcador de selección bacteriana del plásmido pcDNA3.1). Estos fueron incubados toda la noche en agitación a 37°C para permitir su crecimiento hasta obtener una densidad óptica elevada (OD=2-3).

Para la extracción y purificación del ADN plasmídico, se utilizó el kit *GeneJET Plasmid Midiprep* de la casa comercial Thermo Scientific™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo incluye una primera parte de lisis alcalina junto con SDS que favorece la ruptura de las membranas celulares y liberación del ADN plasmídico en condiciones desnaturizantes. Después, el lisado se neutraliza permitiendo que el ADN plasmídico hibride de nuevo pasando a ADN de doble hebra, mientras que los restos celulares, las proteínas, el ADN cromosómico y el SDS precipitan tras una centrifugación. En la segunda parte del protocolo, el sobrenadante obtenido, que contenía el ADN plasmídico, se hace pasar por columnas de sílice a las que se une el ADN plasmídico debido a la alta concentración de sales de la solución de lisis, que permite que el ADN exponga sus cargas negativas (normalmente unidas a moléculas de agua) y se una a las cargas positivas de la columna. Las proteínas y el resto de los contaminantes del proceso no se unen y se eliminan mediante diversos lavados con soluciones de alta concentración en sales. Por último, para eluir el ADN adsorbido en la columna, se utiliza una solución con muy baja concentración salina (o agua) que permite la rehidratación del ADN y su liberación de la columna.

a. Cuantificación del ADN plasmídico obtenido

Tras la purificación, se llevó a cabo la cuantificación en NanoDrop™ Thermo Scientific™, un espectrofotómetro UV-Visible que permite el análisis de microvolúmenes de ácidos nucleicos y proteínas. Este consta de un brazo móvil sobre una pequeña superficie donde se coloca la muestra. Al cerrar el brazo se crea una columna de muestra, a través de la cuál pasa un haz de luz y se registra la absorbancia a longitud de onda 260 nm, junto con los ratios de absorbancia a 260/280nm y 260/230nm que determinan la presencia de proteínas o reactivos de la extracción (alcoholes), respectivamente. Para muestras de ADN, el índice de pureza A260/280 se considera aceptable en valores cercanos a 1.8, mientras que el índice A260/230 se considera puro entre 1,8 y 2,2.

Se utilizó como blanco el buffer de elución. La concentración final de ADN se expresó en ng/μl y el equipo la calcula mediante una variación de la ecuación de Beer-Lambert que correlaciona absorbancia y concentración.

b. Conservación del plásmido

El ADN plasmídico obtenido se conservó a -20°C para períodos cortos de tiempo previo a su uso, y a -80°C para periodos más largos (superior a 2-3 días).

3.4. Silenciamiento y sobreexpresión de MBNL1 en líneas celulares

Se llevó a cabo la transfección de 2 silenciadores de ARN comerciales (*small interference RNA*, siRNA) del gen que codifica para *MBNL1* (A: ID144464, B: ID144465, Invitrogen) para conseguir el silenciamiento de la expresión de dicho gen. El uso de dos siRNA diferentes garantiza que los resultados obtenidos se deben al silenciamiento de dicho gen y no a efectos fuera de objetivo. Por otro lado, se transfectó el plásmido extraído anteriormente para conseguir su sobreexpresión.

Se utilizó el método de lipofección, basado en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN/ARN. Estos complejos tienen afinidad por la membrana, lo que permite su entrada en el citosol. En concreto utilizamos el reactivo lipofectamina (*Lipofectamine 2000*, Invitrogen) siguiendo el siguiente protocolo para un volumen final de 1 ml:

1. Combinar, por un lado, 10 μl de lipofectamina con 60 μl de medio Optimem y, por otro lado, el material genético que queremos introducir (20 μl del silenciador a concentración inicial 5 μM o 2 μg de plásmido) también con 60 μl de Optimem. Ambas mezclas se incuban 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Mezclar ambas combinaciones y dejar 20 minutos para permitir la formación de micelas lipídicas que contienen en su interior el material genético. Esta mezcla constituye el medio de transfección.
3. Lavar las células que queremos transfectar con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo completo.
4. Incorporar el medio de transfección (2 ml en frascos de 25 ml / 4 ml en frascos de 75 ml) a las células junto con 850 μl medio sin suplementar y permitir que se lleve a cabo la transfección en el incubador a 37°C durante 4 a 6 horas.

5. Retirar el medio de transfección y volver a lavar las células con PBS para eliminar los restos de lipofectamina.
6. Añadir medio de cultivo suplementado a las células para su crecimiento y posterior mantenimiento.

Además, se utilizaron controles negativos tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión con el objetivo de descartar que el efecto observado se debe a la introducción de material genético aleatorio y exógeno en las células. Así, en el silenciamiento se realizó un control *scramble*, en el cual se introdujeron en las células secuencias aleatorias de ARN pequeñas, mientras que para la sobreexpresión se introdujo plásmido pcDNA3.1 vacío, es decir sin la secuencia de *MBNL1*.

3.5. Ensayo de proliferación

Se realizó un ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1 para cuantificar la proliferación celular mediante espectrofotometría. Este ensayo analiza el número de células viables basándose en la escisión de sales de tetrazolio añadidas al medio de cultivo. Las sales de tetrazolio son escindidas dando lugar al colorante formazán gracias a las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (**figura 5**), cuya actividad se incrementa en las divisiones celulares. De esta forma, la tasa de proliferación celular será proporcional a la cantidad de formazán en el medio.

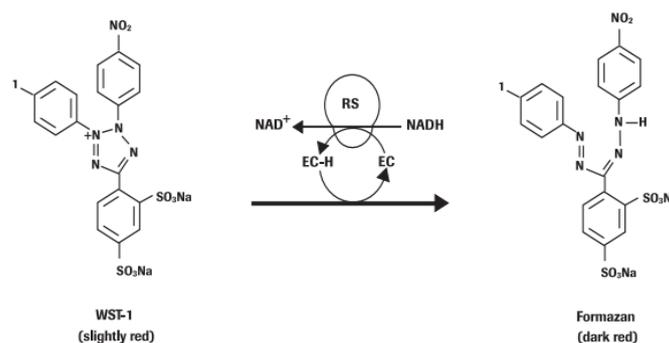


Figura 5. Transformación del reactivo WST-1 en el colorante formazán por enzimas mitocondriales. Fuente: Sigma Aldrich, 2021.

Para realizar este ensayo, 24 horas después de la transfección, se procedió a la siembra de las células de cada condición (control, silenciamiento o sobreexpresión de *MBNL1*) en una placa de 96 pocillos. Se sembraron 5000 células por pocillo en un volumen de

100 µl de medio completo, y las placas se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. La medida de proliferación se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas tras la siembra. Para ello, una vez transcurrido cada tiempo, se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 7 µl de WST-1 en 100 µl de medio de cultivo incoloro en cada pocillo. Por último, se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas y se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos.

Para la cuantificación del colorante formazán producido por células metabólicamente activas se obtuvo la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm junto con la resta de una segunda longitud de onda de 650 nm como corrección de fondo.

El análisis de los resultados de este ensayo fue de tipo comparativo entre la absorbancia registrada para la condición control (considerada como el 100%) y el silenciamiento o sobreexpresión de MBNL1.

3.6. Ensayo de migración e invasión celular

En términos generales, este ensayo mide la capacidad de migración e invasión de las células estimulada por un agente quimiotáctico, en este caso suero. La diferencia entre el ensayo de invasión y el de migración radica en que, el ensayo de migración mide el porcentaje de células que pasan a través de una membrana de filtro a favor del gradiente de suero, mientras que en el experimento de invasión las células, además, deben atravesar una capa de matrigel que simula la matriz extracelular colocada sobre dicha membrana de filtro. Así, para este experimento se emplearon insertos de cultivo celular de membrana porosa de 8µm (TermoFisher) que se colocaron en placas de 24 pocillos.

a. Siembra

En primer lugar, las células para cada condición se dejaron crecer durante 24 horas con medio sin suero hasta obtener confluencia, de forma que las células se encontraban en una situación de privación de nutrientes (también llamado *serum starvation*). Con esto se consigue que las células migren o invadan en busca de una fuente de nutrientes. Después, se sembraron 5×10^4 células en 200 µl de medio sin suero en la parte superior de los insertos.

b. Ensayo de migración

Para promover la migración de las células, se añadieron en el fondo de cada pocillo, 700 µl de medio suplementado con suero, que actúa como quimioatrayente. Así, las

células con capacidad migratoria pasarán a través de los poros de la membrana filtrante de los insertos en dirección al medio suplementado con suero en el fondo del pocillo. La duración del ensayo fue de 16-24 horas antes de realizar la tinción para contar las células que atraviesan las membranas.

c. Ensayo de invasión

En el ensayo de invasión, se añadió una capa de matrigel sobre la membrana de los insertos que las células debían atravesar en los pocillos, siendo el resto las mismas condiciones que en el ensayo de migración.

Un día antes de realizar el experimento se puso el matrigel a 4°C en hielo para que pase a estado líquido (es sólido a temperatura ambiente/alta). Al día siguiente, se realizó la dilución del mismo a 1 mg/ml en medio DMEM. Se mantuvieron las placas en hielo para evitar la solidificación del matrigel y se cubrieron con 50 µl de matrigel en la superficie de cada membrana evitando formar burbujas. Las placas se incubaron a 37°C durante 30-45 minutos para conseguir la solidificación del matrigel antes de la siembra.

La duración del ensayo también fue de 16-24 horas, para después realizar la tinción y contar las células que atraviesan las membranas.

d. Tinción

Una vez transcurrido el tiempo de migración/invasión, se eliminó el medio de los pocillos y se lavaron los insertos con PBS. A continuación, se fijaron las células con etanol frío al 70% durante 2 minutos y, después, con metanol 100% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se tiñeron las células con cristal violeta (0.4% cristal violeta en agua destilada) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La tinción con este colorante permite cuantificar las células adheridas y viables, ya que se une al ADN y a las proteínas (las células adherentes se desprenden de la superficie de cultivo durante la muerte celular). Se eliminaron las células de la parte superior de las membranas/matrigel (sin capacidad migratoria o de invasión) utilizando un bastoncillo y se volvieron a lavar con PBS. Por último se dejaron secar y se procedió al cálculo del número de células que habían invadido o migrado a través de la membrana y que, por tanto, se encontraban en la parte inferior de la misma. Se tomaron, al menos, 5 imágenes con el microscopio invertido utilizando un objetivo de 10X y se analizaron mediante el programa de procesamiento de imágenes digital ImageJ.

e. Cálculo del número de células con capacidad de invasión/migración:

Para calcular el porcentaje de migración / invasión se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Promedio del nº de células que migran/invaden en favor del quimioatrayente}}{\text{Promedio del nº de células que migran/invaden en situación control}} \times 100$$

Al igual que en el ensayo de proliferación, el análisis de resultados de este ensayo fue de tipo comparativo, de forma que el porcentaje de células que migran/invaden en la situación control se consideró el 100% y, frente a este valor, se calculó el porcentaje relativo en el resto de las condiciones experimentales.

3.7. Ensayo de formación de colonias

Para evaluar la capacidad de formar colonias, se sembró en placas de 6 pocillos una pequeña cantidad de células, 500 por pocillo, de forma que las células estuviesen muy separadas entre ellas y cada colonia se originase a partir de una única célula, y se dejaron crecer en su medio óptimo durante 14 días. Transcurrido este tiempo se habían formado colonias de, al menos, 50 células que fueron las contabilizadas en este ensayo. Después, se fijaron y tiñeron las células con cristal violeta siguiendo el mismo protocolo utilizado en el ensayo de migración/invasión (paso 4). Por último, se escanearon las placas y se contaron las colonias de cada pocillo.

El análisis de los resultados también se realizó en referencia a la situación control, considerada como el 100% de capacidad de formación de colonias.

3.8. Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc

a. Extracción de ARN con Trizol a partir de pellets celulares

El método elegido fue la extracción mediante guanidina isotiocianato-fenol-cloroformo. Todo el proceso se realizó en una cabina de extracción de gases debido a la toxicidad de los disolventes empleados. Toda manipulación de ARN se realizó siempre en hielo para evitar su degradación.

En primer lugar, se homogeneizó el pellet de células con 500 µl de trizol, una solución monofásica compuesta por guanidina isotiocianato y fenol de que permite la lisis de las células manteniendo la integridad del ARN mediante la inhibición de las ribonucleasas (ARNasas). Se añadieron 100 µl de cloroformo, que separa en fases los componentes celulares. Se dejó 3 minutos en reposo en hielo y se centrifugó durante 15 minutos a

1300 rpm y 4°C. Se generaron 2 fases, una fase orgánica en la parte inferior del tubo y una fase acuosa en la parte superior que contenía el ARN, separadas por una interfase de restos celulares y ADN. Recuperamos la fase acuosa, que contiene el ARN, y añadimos 250 µl de isopropanol para conseguir su precipitación, dejándolo toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 1300 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol frío al 75% mezclando en vórtex y, por último, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores eliminando el etanol por completo. Se resuspendió el ARN en 20-50 µl de agua libre de ARNsa, en función del tamaño del pellet de ARN. Las muestras se conservaron en tubos tipo eppendorf a -80°C.

b. Cuantificación del ARN extraído

Para la cuantificación se usó Thermo Scientific NanoDrop. En este caso, se utilizó como blanco agua libre de ARNsa.

c. Retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción o transcripción inversa se emplea para transformar el ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario (ADNc). Así, una vez cuantificado, se llevó a cabo la retrotranscripción a ADNc a partir de 1 µg de ARN (se diluyó en agua libre de ARNasas en caso de ser necesario hasta obtener una concentración de 1ug/uL). Se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* de Applied Biosystems y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los reactivos añadidos en cada pocillo aparecen en la **tabla 3**.

| | |
|------------------------------|----------------------|
| <i>ARN</i> | 1 µg |
| <i>RT Buffer 10x</i> | 4 µl |
| <i>Universal Primers 10x</i> | 4 µl |
| <i>dNTPs</i> | 1,6 µl |
| <i>Retrotranscriptasa</i> | 2 µl |
| <i>Agua</i> | 8,4 µl - volumen ARN |
| <i>Volumen final</i> | 20 µl |

Tabla 3. Reactivos utilizados en la reacción de retrotranscripción.

Además, se incluyó un pocillo como control negativo de la retrotranscripción, en el cual no se añadió ARN (se puso agua en su lugar).

El programa configurado para llevar a cabo la reacción fue de 10 minutos a 25°C y 2 horas a 37°C en el termociclador *9700HT Fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems). El ADNc obtenido se conservó a 4°C hasta el momento de su uso para la PCR cuantitativa a tiempo real.

3.9. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo utilizando la tecnología de sondas TaqMan (*TaqMan Gene Expression Assays* de Applied Biosystems). Cada ensayo TaqMan consta de un par de cebadores universales sin marcaje fluorescente y una sonda TaqMan de 18-22 pb, específicos del gen de interés. Estas sondas poseen en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un inhibidor de fluorescencia o *quencher*. Debido a la cercanía de ambas moléculas en la sonda, cuando esta es irradiada a una determinada longitud de onda, el fluoróforo excitado transfiere energía a la molécula *quencher* en lugar de emitir fluorescencia, lo que se conoce como efecto de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Esta transferencia de energía ocurre cuando se solapa el espectro de emisión del fluoróforo con el espectro de absorción de la molécula *quencher*, evitando así la emisión de fluorescencia mientras la sonda esté intacta. Sin embargo, esta proximidad no apaga completamente la fluorescencia del fluoróforo y se observa una fluorescencia de fondo. Durante la PCR, la sonda hibrida específicamente entre el cebador directo/inverso en una región interna del producto de PCR. A continuación, la Taq polimerasa (una ADN polimerasa termoestable) lleva a cabo la extensión del cebador y replica la secuencia complementaria a la sonda TaqMan. Al llegar al extremo 5', que contiene el fluoróforo, la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa escinde la sonda, produciendo un aumento en la intensidad de fluorescencia. Este proceso se repite en cada ciclo y no interfiere con la acumulación de producto de PCR. Así, la cantidad de fluorescencia será proporcional a la cantidad de amplicones (secuencias amplificadas) sintetizados.

Los componentes de la reacción que tiene lugar en cada pocillo se muestran en la **tabla 4**. Entre ellos, la *Master Mix* contiene la enzima ADN polimerasa. Las sondas Taqman empleadas en este trabajo fueron: *GAPDH* (ID: Hs03929097, Invitrogen) y *MBNL1* (ID: Hs01582594, Invitrogen).

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>TaqMan Universal Master Mix</i> | 5 μ l |
| <i>Taqman Assay</i> | 0'5 μ l |
| <i>H2O</i> | 2'5 μ l |
| <i>ADNc</i> | 2 μ l |
| Volumen final | 10μl (placa 384 pocillos) |

Tabla 4. Volumen de los reactivos utilizados en la reacción de qPCR.

Cada condición experimental con cada sonda Taqman se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos para obtener resultados de mayor rigor y también se incluyó un control negativo de RT-qPCR, en el cual no se añadió ADNc, sino agua.

Una vez incorporados todos los reactivos en cada pocillo de la placa de PCR, esta se cubre con papel film transparente que permite medir la fluorescencia emitida por las sondas. La reacción tuvo lugar en oscuridad en el termociclador QuantStudio 5 de Applied Biosystems siguiendo el programa de ciclos e intervalos de temperatura que aparece en la **tabla 5**.

| Nº de ciclos | 1 | 1 | 40 | 1 | |
|---------------------|----------|----------|-----------|----------|-------|
| Temperatura | 50°C | 95°C | 95°C | 60°C | 4°C |
| Tiempo | 2 min | 10 min | 15 seg | 1 min | Final |

Tabla 5. Programa de ciclos y temperatura utilizado en la reacción de qPCR.

Al comienzo de la reacción de PCR en tiempo real, se eleva la temperatura para desnaturalizar el ADNc bicatenario (95°C). Durante este paso, la señal fluorescente en el extremo 5' de la sonda TaqMan está apagada por el *quencher* en el extremo 3' de la sonda. En el siguiente paso, la temperatura de reacción se reduce a 60°C para permitir que los cebadores y la sonda hibriden con sus secuencias diana específicas. La Taq polimerasa sintetiza ADN complementario utilizando los cebadores y el ADNc y, cuando la polimerasa alcanza la sonda TaqMan, su actividad nucleasa 5' endógena escinde la sonda, separando el fluoróforo del *quencher*. Con cada ciclo de PCR, se liberan más moléculas fluorescentes, lo que da como resultado un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado.

a. Cuantificación y análisis de la expresión génica

Los resultados se visualizaron en el programa QuantStudio y posteriormente se analizaron en una hoja de cálculo Excel. Los resultados obtenidos de la PCR son los valores de *threshold cycle* (CT) para cada muestra, el cual es el ciclo de amplificación en el que la fluorescencia resultante de la reacción supera el valor de fluorescencia establecido como umbral. Para el análisis, se empleó el método comparativo del ciclo umbral (*comparative cycle threshold method* ($2^{-\Delta\Delta CT}$)). Este método consiste en obtener, para cada condición, la diferencia entre el CT del gen de interés y el del gen endógeno *GAPDH* (ΔCT) (se trata de un gen de expresión constitutiva o gen *housekeeping* cuya expresión es siempre la misma en todas las células), y luego obtener la diferencia entre el ΔCT del gen de interés en cada condición experimental respecto al ΔCT de ese mismo gen en el control ($\Delta\Delta CT$). El valor de la expresión génica para cada condición experimental se calcula como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.10. Extracción de proteínas y análisis por Western Blot

a. Extracción de proteína

Para la extracción de todas las proteínas de nuestras líneas celulares se realizó un primer paso de lisis celular con el reactivo *Pierce RIPA buffer* (Thermo Scientific), que contiene compuestos que desestabilizan las membranas celulares y favorecen la lisis (TrisHCl, NaCl, NP-40, *sodium deoxycholate*, SDS), junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se sometieron a sonicación durante 10 segundos a 40% de amplitud. Después se centrifugó la muestra a 4°C y 13,2 rpm durante 30 minutos para conseguir la precipitación de los restos celulares (el pellet fue descartado) y se conservó el sobrenadante que contenía las proteínas.

b. Cuantificación de proteína

Se realizó mediante un ensayo de detección colorimétrica con el kit *BCA Pierce Protein Assay* de ThermoFisher Scientific. Este kit permite la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), que combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} generada por las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} que reacciona con el ácido bicinonínico. El producto de la reacción, formado por dos moléculas de BCA y un ion Cu^{+1} , da lugar a un complejo hidrosoluble de color púrpura que absorbe a 595 nm de manera lineal con concentraciones de proteína crecientes.

Se siguieron las indicaciones de la casa comercial, realizando una recta patrón con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (0.025, 0.02, 0.015, 0.01 y 0.005 ug/ml) para obtener así la ecuación de dicha recta, sobre la cual se calcularon las concentraciones de proteína de cada muestra. Se realizaron 3 réplicas técnicas, tanto de las concentraciones de BSA para la recta patrón, como de las muestras. Se añadieron 200 µl de la combinación de dos reactivos, solución A y B, a una relación 1B:50A a cada pocillo en una placa de 96, junto con 25 µl a una dilución 1:10 del sobrenadante con las proteínas extraídas. Las placas se conservaron en oscuridad durante 30 minutos y, finalmente, se cuantificó la absorbancia a 595 nm.

c. Electroforesis, transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado

La separación de las proteínas en función de su tamaño se realizó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) y, después, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en BSA durante 1 hora, cubriendo los lugares donde no se ha unido proteína para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, y se dejaron incubando con los anticuerpos primarios correspondientes a cada proteína (**tabla 6**) durante toda la noche con agitación en cámara fría. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween (solución salina tamponada con Tris) para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron con el anticuerpo secundario (**tabla 6**) durante 1 hora. Finalmente se realizaron de nuevo 3 lavados con TBS-Tween y se revelaron las membranas. Los anticuerpos se prepararon en BSA al 1% p/v a dilución 1:1000 (anticuerpos primarios) o 1:2000 (anticuerpos secundarios) mediante agitación.

El tipo de revelado que se utilizó fue mediante quimioluminiscencia, utilizando los reactivos Luminol (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*) y Femto (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*) de Thermo Fisher. Este método de revelado se basa en la conversión de un sustrato químico que, mediante la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a los anticuerpos secundarios, da lugar a un producto quimioluminiscente detectado por el revelador. Cuando los niveles de proteína eran muy bajos se utilizó el sustrato Femto, capaz de detectar niveles de proteína de femto-gramos (ECL detecta niveles de picogramos).

| Nombre del anticuerpo | Referencia |
|----------------------------|------------------------|
| Anti-ALDH1 | Abcam ab52492 |
| Anti- β -Catenin | Cell Signaling (D10A8) |
| Anti-CD24 | Termofisher MA5-11828 |
| Anti-CD44 | Cell signaling (3570) |
| Anti-CTNNB1 | Cell Signaling (9562) |
| Anti-E-Cadherin | Cell Signaling (24E10) |
| Anti-Fibronectin | Abcam (ab32419) |
| Anti-Gapdh | Abcam (ab8245) |
| Anti-mbn1 | Termofisher PA5-19739 |
| Anti-N-Cadherin | Cell Signaling (4061) |
| Anti-nanog | Cell Signaling (4903) |
| Anti-oct4 | Cell Signaling (2840) |
| Anti-snai | Cell Signaling (3879) |
| Anti-sox2 | Cell Signaling (3579) |
| Anti-Vimentin | BD Pharmigen (550513) |
| Anti-mouse IgG HRP-linked | Cell Signaling (7076) |
| Anti-rabbit IgG HRP-linked | Cell Signaling (7074) |

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis por Western Blot.

3.11. Análisis de expresión de *MBNL1* en bases de datos públicas

Se realizó un análisis correlativo entre la expresión de *MBNL1* y la supervivencia libre de metástasis mediante el software Kaplan Meier Plotter, que utiliza la información de pacientes incluidos en bases de datos públicas (Gyorffy *et al.*, 2010). Se consideró el valor de la mediana como punto de corte para clasificar a las pacientes entre nivel alto y bajo de expresión de *MBNL1*. Se seleccionaron pacientes con expresión negativa para HER2, ER y PR (triple negativas) y con disponibilidad de información de la expresión de *MBNL1* y supervivencia libre de metástasis (DMFS), obteniendo una cohorte de 224 pacientes. Se calculó el Hazard Ratio, el intervalo de confianza (95% CI) y el log-rank p valor.

3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de los ensayos entre condiciones se realizó con el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc,) aplicando una prueba *t de Student* considerando datos no pareados, ya que siempre se comparan dos grupos de muestras aleatorias, independientes e idénticamente distribuidas. Todos los experimentos se realizaron con, al menos, 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas. Todos los datos representados incluyen la desviación estándar. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P \leq 0,05$. Los asteriscos representados en las gráficas hacen referencia al p valor: *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$), ****($p < 0.0001$).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de las características de la línea celular MDA-MB-231R en comparación con MDA-MB-231

Como se ha mencionado anteriormente, dado que la línea celular MDA-MB-231R se generó mediante presión selectiva con doxorrubicina a partir de su línea parental MDA-MB-231, se utilizó en este proyecto como modelo de CMTN más agresivo. Con el objetivo de caracterizar dicha línea celular, se comparó el fenotipo de las líneas celulares MDA-MB-231R y MDA-MB-231 en procesos involucrados en la metástasis, como proliferación, EMT y características de CSC. Para ello, se realizaron tanto ensayos de expresión de proteínas como ensayos funcionales.

4.1.1. Estudio de la proliferación celular

La capacidad proliferativa de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231R se analizó mediante el ensayo con WST-1 y se midió el nivel basal de expresión de la ciclina E2 (CCNE2) mediante *Western Blot*. CCNE2 se utiliza como marcador de ciclo celular debido a que es una proteína de control en la fase G1/S. Así, a mayor nivel de expresión de esta ciclina, mayor es el número de células que han iniciado el ciclo celular y se encuentran en proliferación.

Los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares MDA-MB-231 *wild-type* y resistente y, en concordancia con este resultado, ambas líneas celulares no presentaron diferencias de expresión basal de CCNE2 entre ellas (**Figura 6**).

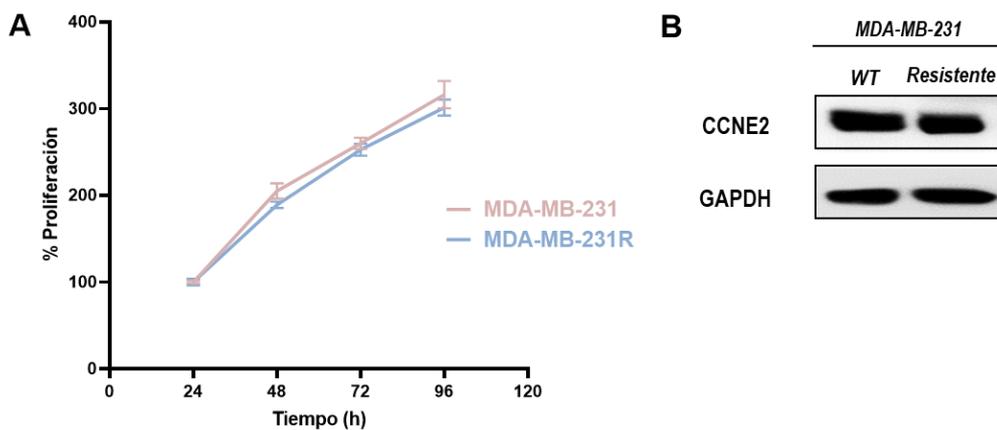


Figura 6. Análisis de la proliferación celular en las líneas celulares MDA-MB-231 *wild-type* y resistente. A) Ensayo WST-1 realizado tras 24, 48, 72, y 96 horas. La gráfica representa el valor promedio y desviación estándar para cada tiempo. B) Nivel de expresión de la proteína CCNE2 medida mediante *Western Blot*. Se utilizó GAPDH como control endógeno.

4.1.2. Estudio de la transición epitelio-mesenquimal

Se realizó un ensayo funcional para analizar la capacidad de migración e invasión y se estudió mediante *Western Blot* la expresión de las proteínas marcadoras de EMT fibronectina (FN1), vimentina (VIM), b-catenina (CTNNB1), E-cadherina (CDH1) y N-cadherina (CDH2), así como del factor de transcripción inductor de EMT, SNAIL1.

En el ensayo funcional se observó un mayor porcentaje de células con capacidad migratoria ($p < 0.0001$) e invasiva ($p < 0.01$) en la línea MDA-MB-231R frente a MDA-MB-231 como se observa en la **figura 7A y B**, respectivamente. Además, la línea resistente mostró un nivel mayor de expresión de las proteínas FN1, VIM, CTNNB1 y CDH2, así como en el factor de transcripción SNAIL1, mientras que el nivel de CDH1 fue destacablemente menor en MDA-MB-231R en comparación con la línea *wild-type* (**Figura 7C**). Estos resultados indican que, como se esperaba, la línea resistente presenta un fenotipo más mesenquimal que la *wild-type*, así como propiedades más agresivas en cuanto a migración e invasión.

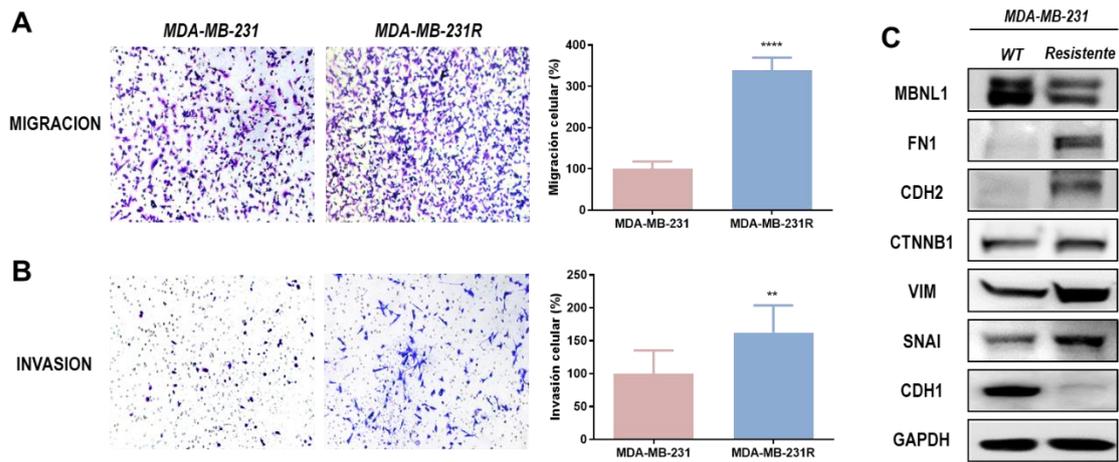


Figura 7. Análisis de capacidad de migración, invasión y de marcadores de EMT y en las líneas celulares MDA-MB-231 *wild-type* y resistente. Imagen representativa (aumento 10X) y representación gráfica del ensayo de migración (**A**) e invasión (**B**). Se muestra el valor promedio del porcentaje de células que migraron/invadieron junto con la desviación estándar. (**C**) Nivel de expresión de marcadores de EMT mediante ensayo de *Western Blot*. GAPDH se usó como control endógeno. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4.1.3. Estudio de las propiedades de célula madre cancerosa

Dado que el fenotipo mesenquimal se relaciona con el fenotipo de CSC, se estudiaron también las propiedades de CSC en las líneas celulares MDA-MB-231 *wild-type* y resistente mediante un ensayo funcional de formación de colonias y el análisis de expresión de marcadores de CSC mediante *Western Blot*. En concreto, se analizaron los principales marcadores que caracterizan a las BCSC, ALDH1⁺, CD44⁺ y CD24^{-bajo}, junto con otros tres marcadores generales de célula madre: SOX2, OCT4 y NANOG.

En el ensayo de formación de colonias se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con un mayor recuento de colonias formadas en la línea celular resistente en comparación con MDA-MB-231 *wild-type* (**figura 8A**). Así mismo, los resultados de *Western Blot* mostraron niveles incrementados de los marcadores de CSC en la línea celular MDA-MB-231R respecto a los niveles de expresión de estas en la línea MDA-MB-231 *wild-type* (**figura 8B**). Como se esperaba, el marcador CD24 no mostró este aumento de expresión, puesto que las CSCs presentan bajos niveles de esta proteína. Por tanto, la línea MDA-MB-231R presentó una mayor capacidad de

formación de colonias a partir de células independientes, y mayor expresión de marcadores de CSC, en comparación con la línea MDA-MB-231.

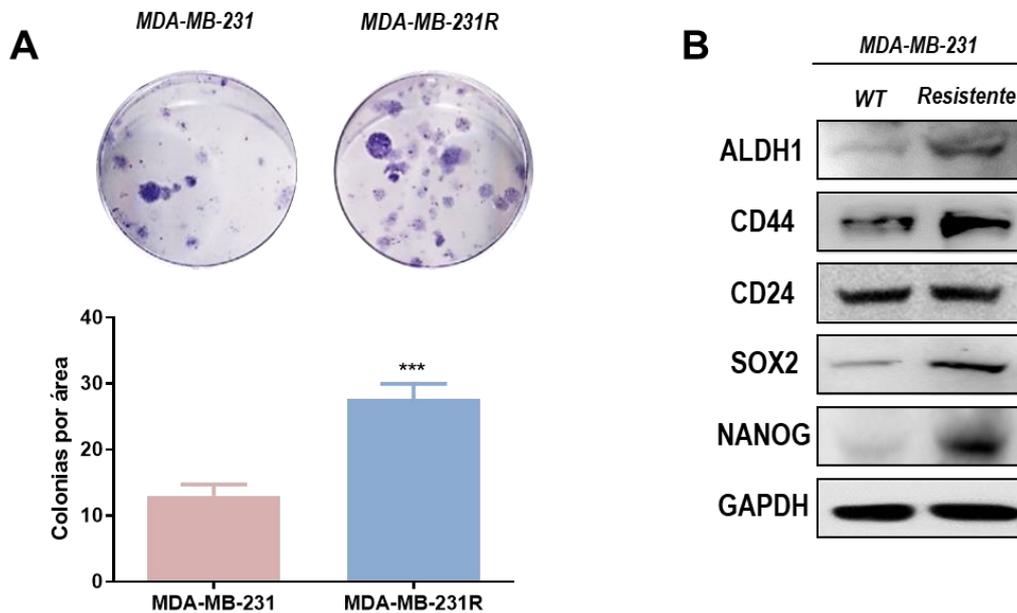


Figura 8. Análisis de la capacidad de formación de colonias y de la expresión de marcadores de CSCs en las líneas MDA-MB-231 *wild-type* y resistente. A) Imágenes representativas del ensayo de formación de colonias en ambas líneas celulares y representación gráfica del valor promedio del número de colonias contabilizadas junto con la desviación estándar. B) Nivel de expresión de marcadores de CSC mediante *Western Blot*. GAPDH se utilizó como control endógeno. *** $p < 0.001$.

4.1.4. Análisis de expresión de MBNL1

Una vez caracterizadas las líneas celulares MDA-MB-231 *wild-type* y resistente en el contexto de los principales procesos involucrados en metástasis, y dado que la línea MDA-MB-231R mostró un fenotipo más agresivo, se estudió el nivel de expresión de MBNL1 entre ambas líneas celulares. Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, en cuyos resultados se observó que la línea celular MDA-MB-231R presentaba una menor expresión de ARNm de *MBNL1* ($p < 0.001$) al igual que de la proteína, en comparación con MDA-MB-231 (**Figura 9**).

Este resultado nos llevó a la hipótesis de que MBNL1 puede tener un papel en la regulación del fenotipo mesenquimal y de CSC en CMTN.

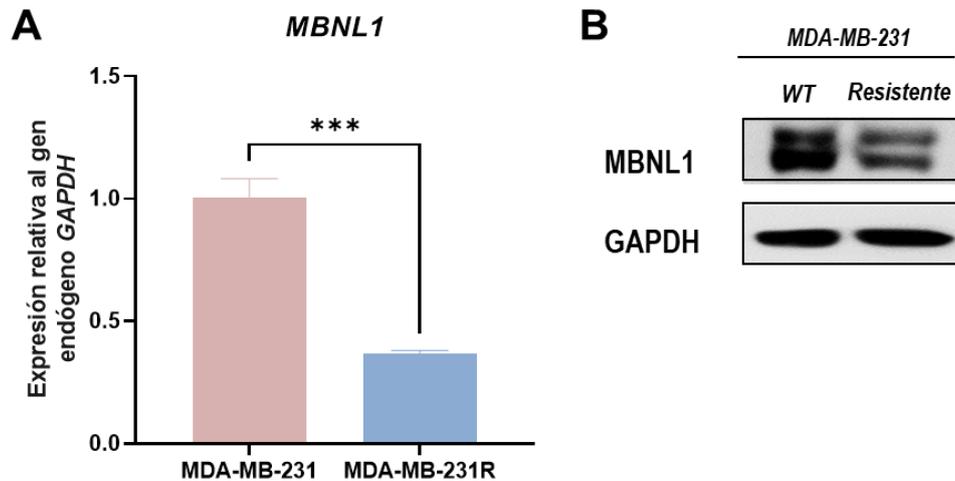


Figura 9. Expresión de MBNL1 en las líneas MDA-MB-231 *wild-type* y resistente. A) Niveles de ARNm de *MBNL1* analizados mediante RT-qPCR. La gráfica muestra el valor promedio y desviación estándar de la expresión relativa al gen endógeno *GAPDH*. B) Expresión de la proteína MBNL1 mediante *Western Blot*. GAPDH como control endógeno. *** $p < 0.001$

4.2. Efecto de la pérdida y ganancia de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-MB-436, MDA-MB-231 y MDA-MB-231R

A continuación, puesto que MBNL1 es una RBP que regula la expresión de determinados genes diana, se planteó la hipótesis de que MBNL1 podría ser responsable, al menos en parte, de las diferencias observadas entre las líneas celulares MDA-MB-231R y MDA-MB-231, modulando la expresión del fenotipo mesenquimal y de CSC.

Para comprobar esta hipótesis, se estudió cómo afectaba la pérdida y ganancia de función de MBNL1 al resultado de los ensayos funcionales y de expresión de ARNm y proteína realizados anteriormente. La pérdida de función se consiguió mediante el silenciamiento génico con siRNAs en dos líneas celulares: por una parte la línea MDA-MB-231 como modelo de cáncer de mama menos agresivo, basándonos en los resultados anteriormente obtenidos, y por otro lado, la línea MDA-MD-436 se utilizó como una segunda línea celular estándar de CMTN, con la finalidad de obtener

resultados más robustos en varios modelos. La ganancia de función se analizó en la línea MDA-MB-231R mediante sobreexpresión con un vector plasmídico, puesto que tenía menores niveles basales de MBNL1 respecto a su línea parental y un fenotipo más agresivo. Así, el objetivo era revertir el fenotipo en ambas direcciones.

4.2.1. Análisis de la eficacia de silenciamiento y sobreexpresión de MBNL1

Por un lado, se transfectaron las líneas celulares MDA-MB-436 y MDA-MB-231 con dos silenciadores del gen *MBNL1* diferentes, SiMBNL1 A y SiMBNL1 B, además de un *scramble* como condición control. Transcurridas 72 horas tras la transfección, se analizó la expresión de MBNL1 a nivel de ARNm y de proteína. De esta forma, el silenciamiento de MBNL1 llevó a una disminución significativa del nivel de ARNm ($p < 0,001$ en MDA-MB-436 y $p < 0,0001$ en MDA-MB-231 para el silenciador A; $p < 0,001$ para el silenciador B en ambas líneas) y proteína (**Figura 10A-D**) en comparación con las condiciones *scramble*. Por tanto, la transfección ocurrió de forma exitosa, confirmando el silenciamiento de *MBNL1* para la correcta realización de los experimentos posteriores.

Por otro lado, para conseguir la sobreexpresión de MBNL1, se transfectó la línea celular MDA-MB-231R con el plásmido pADNc3.1-MBNL1. En este caso, como condición control se transfectó el vector pADNc3.1 vacío. 72 horas después de la transfección, se confirmó la sobreexpresión de MBNL1 mediante RT-qPCR (**figura 10E**) y *Western Blot* (**figura 10F**).

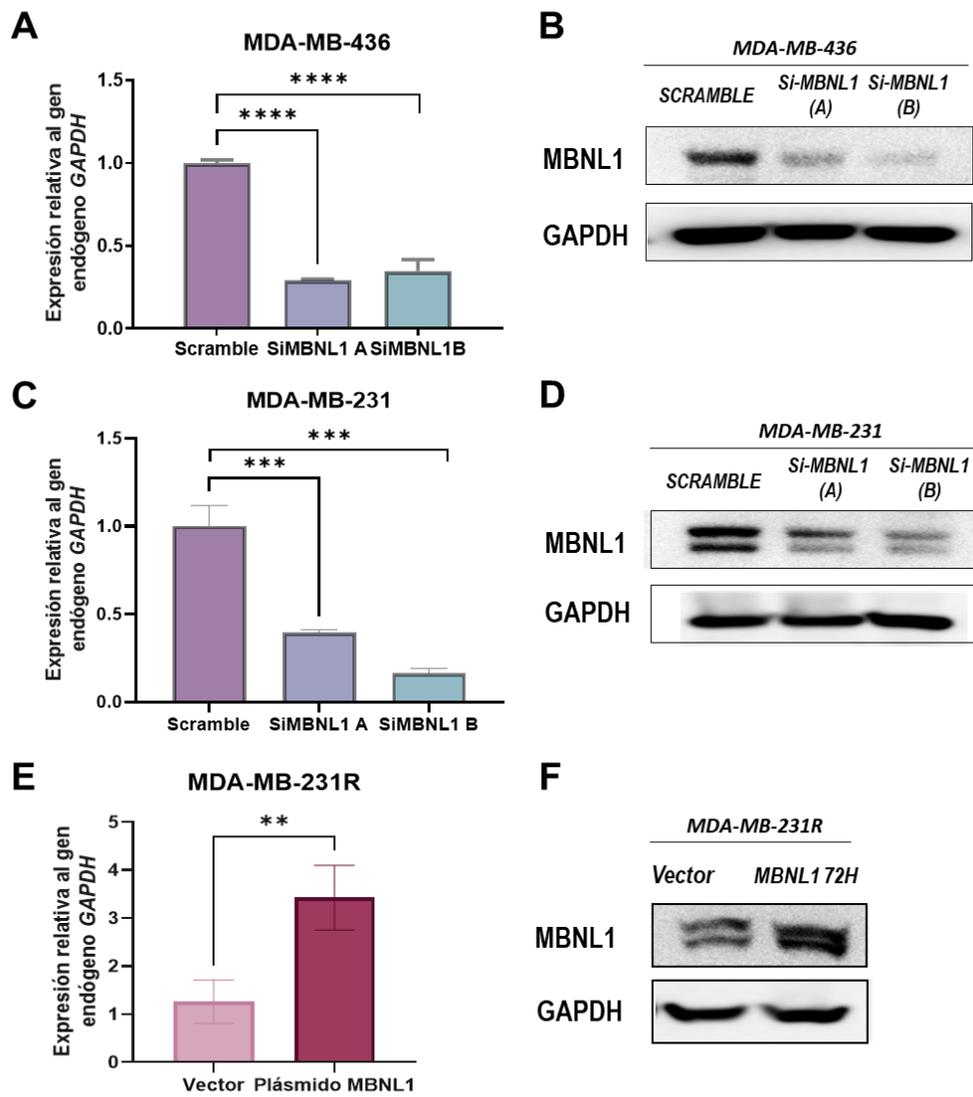


Figura 10. Silenciamiento génico de *MBNL1* mediante dos SiRNA en las líneas MDA-MB-436 y MDA-MB-231 y sobreexpresión de *MBNL1* mediante un vector plasmídico en la línea celular MDA-MB-231R. Niveles de ARNm de *MBNL1* medidos mediante RT-qPCR 72 horas tras la transfección en las líneas MDA-MB-436 (A), MDA-MB-231 (C) y MDA-MB-231R (E). *GAPDH* se usó como control endógeno de expresión. Las gráficas representan la media y desviación estándar. Expresión de la proteína MBNL1 mediante *Western Blot* tras la transfección en las líneas celulares MDA-MB-436 (B), MDA-MB-231 (D) y MDA-MB-231R (F). *GAPDH* como control endógeno. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.2.2. Estudio del efecto de MBNL1 sobre la proliferación celular

Para estudiar el efecto de la expresión de MBNL1 sobre la proliferación celular, se realizaron ensayos funcionales y de expresión de CCNE2 72h tras el silenciamiento o sobreexpresión de MBNL1.

En las líneas celulares MDA-MB-436 y MDA-MB-231 con silenciamiento de MBNL1 se observó una disminución significativa ($p < 0.001$ para el SiMBNL1A y $p < 0.0001$ para el SiMBNL1B a las 96 horas en la línea celular MDA-MB-436; $p < 0.0001$ para ambos silenciadores a las 96 horas en la línea celular MDA-MB-231) en la proliferación en comparación con las condiciones control (**figura 11A y C**). Por otro lado, los resultados obtenidos para la línea celular MDA-MB-231R mostraron una mayor proliferación ($p < 0.01$ a las 96 horas) en las células con sobreexpresión de MBNL1, en comparación con la condición control (**figura 11E**). En concordancia con estos resultados, se observó una menor expresión de CCNE2 en las condiciones con MBNL1 silenciado en comparación con las condiciones control (**figura 11B y D**), mientras que la sobreexpresión de MBNL1 generó niveles mayores de ciclina E2 respecto al control (**figura 11F**). Estos resultados confirmaban una relación directamente proporcional entre la tasa de proliferación y la expresión de MBNL1.

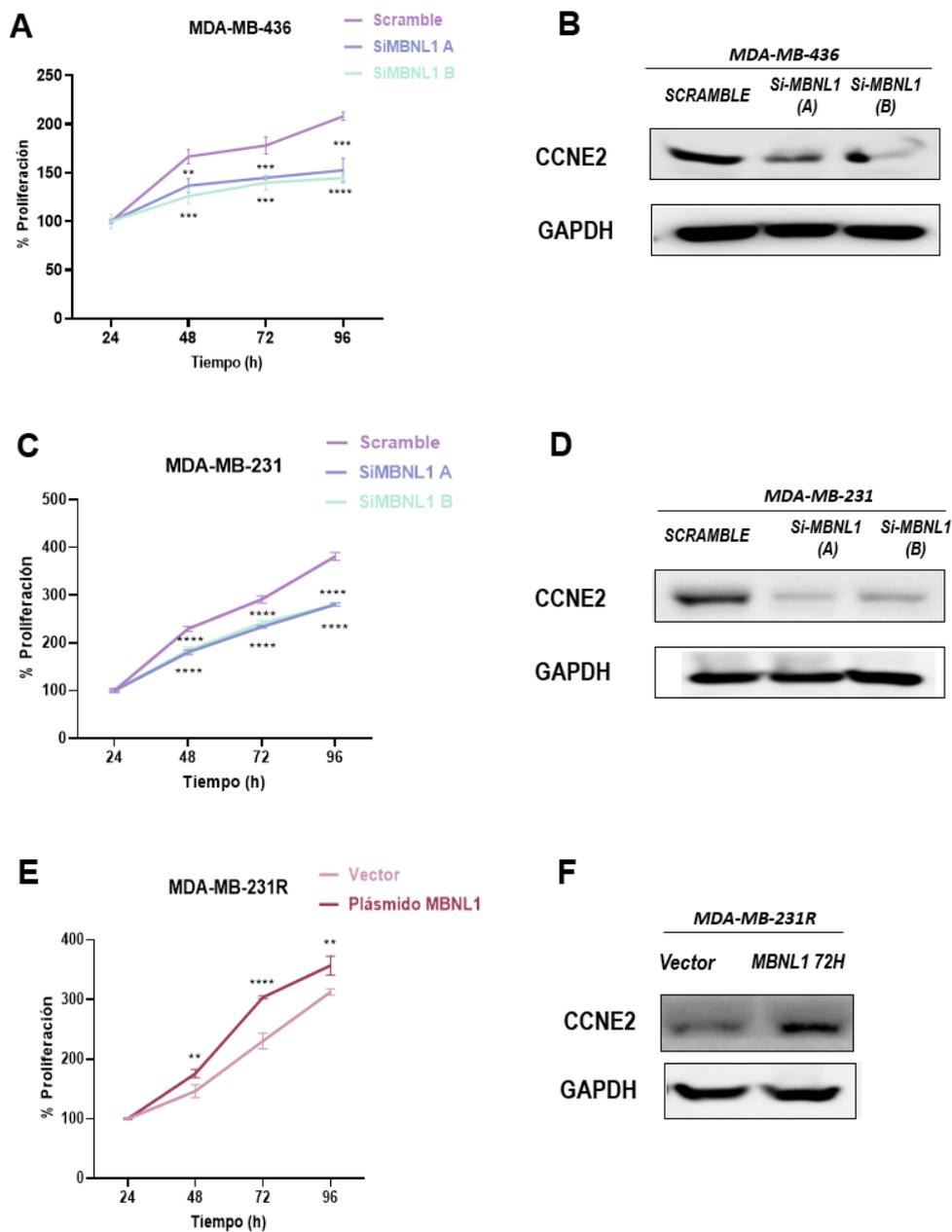


Figura 11. Efecto de la pérdida y ganancia de función de MBNL1 sobre la proliferación celular. Ensayo de proliferación mediante WST-1 tras el silenciamiento de MBNL1 en las líneas celulares MDA-MB-436 (A) y MDA-MB-231 (C); y sobreexpresión de MBNL1 con pADNc3.1-MBNL1 en la línea celular MDA-MB-231R (E). Las gráficas muestran el valor promedio y la desviación estándar en cada tiempo.

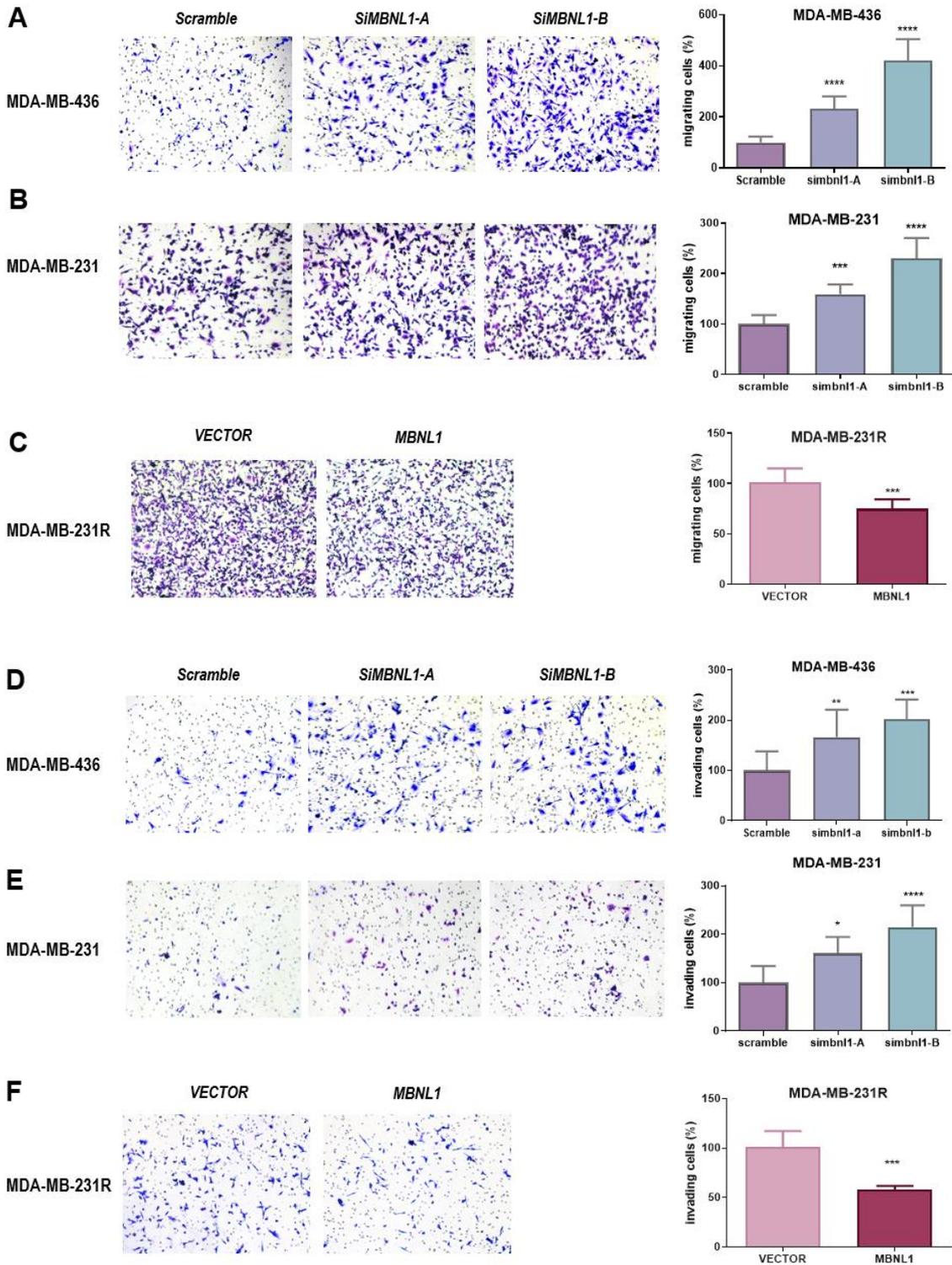
Nivel de proteína de la ciclina CCNE2 medida mediante *Western Blot* 72 horas tras el silenciamiento de MBNL1 en las líneas celulares MDA-MB-436 (B) y MDA-MB-231 (D); y sobreexpresión de MBNL1 en la línea celular MDA-MB-231R (F). Se utilizó GAPDH como control endógeno. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.2.3. Estudio del efecto de MBNL1 sobre la transición epitelio-mesenquimal

Para estudiar el papel de MBNL1 en la EMT, se analizó, por un lado, la capacidad de migración e invasión a nivel funcional y, por otro lado, la expresión de marcadores de EMT tras la pérdida y ganancia de función de MBNL1.

El ensayo de migración e invasión mostró una mayor capacidad migratoria de las líneas celulares tras la pérdida de función de MBNL1 ($p < 0.0001$ para ambos silenciadores en la línea celular MDA-MB-436; $p < 0.001$ para el SiMBNL1A y $p < 0.0001$ para el SiMBNL1B en la línea celular MDA-MB-231) (**figura 12A y B**). La capacidad de invasión se vio también incrementada tras el silenciamiento de MBNL1 ($p < 0.01$ para el SiMBNL1A y $p < 0.001$ para el SiMBNL1B en la línea celular MDA-MB-436; $p < 0.05$ para el SiMBNL1A y $p < 0.0001$ para el SiMBNL1B en la línea celular MDA-MB-231) como se observa en la **figura 12D y E**. En cambio, los resultados de este ensayo en la línea MDA-MB-231R con sobreexpresión de MBNL1 mostraron una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de células que migraron ($p < 0,001$) e invadieron ($p < 0,001$) en comparación con el control (**figura 12C y F**). Por tanto, la menor expresión de MBNL1 se asoció a propiedades del fenotipo mesenquimal, con mayor capacidad de migratoria e invasiva, y viceversa.

Los resultados de *Western Blot* mostraron una mayor expresión de marcadores de EMT tras el silenciamiento de MBNL1 en comparación con la condición control en las líneas celulares MDA-MB-436 y MDA-MB-231 (**Figura 12G y H**). La menor expresión de CDH1 se asoció al aumento en la expresión de CDH2, reflejando el cambio de cadherinas que tiene lugar durante la EMT. Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231R con sobreexpresión de MBNL1 se observó una disminución de los marcadores de EMT (**figura 12I**), con un cambio en el balance de cadherinas hacia el fenotipo epitelial, es decir, aumento de CDH1 y disminución de CDH2.



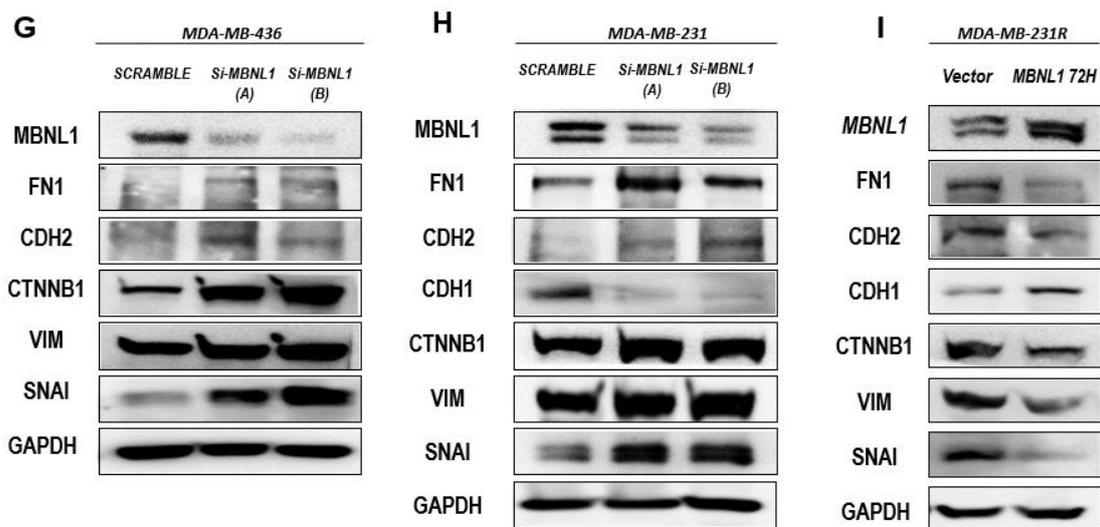


Figura 12. Efecto de la pérdida y ganancia de función de MBNL1 sobre la capacidad de migración, invasión y expresión de marcadores de EMT. Valor promedio del % de células que migraron junto con la desviación estándar e imágenes representativas del ensayo de migración tras la pérdida de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-436 (A) y MDA-MB-231 (B), y tras la ganancia de función de MBNL1 en la línea celular MDA-MB-231R (C). Valor promedio del % de células que invadieron junto con la desviación estándar e imágenes representativas del ensayo de invasión tras la pérdida de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-436 (D) y MDA-MB-231 (E), y tras la ganancia de función de MBNL1 en MDA-MB-231R (F). Nivel de expresión de marcadores de EMT mediante ensayo de *Western Blot* tras el silenciamiento de MBNL1 en las líneas celulares MDA-436 (G) y MDA-MB-231 (H) y tras la sobreexpresión de MBNL1 en MDA-MD-231R (I). GAPDH se utilizó como control endógeno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.2.4. Estudio del efecto de MBNL1 sobre las propiedades de célula madre cancerosa

Para estudiar el efecto de la expresión de MBNL1 sobre las propiedades de CSC se analizó, por una parte, la capacidad de formación de colonias como ensayo funcional y, por otra parte, la expresión de marcadores de CSCs tras el silenciamiento y sobreexpresión de MBNL1.

El ensayo de formación de colonias mostró un aumento estadísticamente significativo del recuento de colonias formadas en las condiciones con silenciamiento de MBNL1 respecto a las condiciones control, tanto en la línea MDA-MB-436 como en la línea MDA-

MB-231 ($p < 0.05$ para SiMBNL1 A y $p < 0.01$ para siMBNL1B en la línea MDA-MB-436; $p < 0.01$ para ambos silenciadores en la línea MDA-MB-231) (**figura 13A y B**). En cambio, los resultados de este mismo ensayo en la línea celular MDA-MB-231R mostraron una disminución significativa en el recuento de colonias formadas ($p < 0.05$) en aquellas células transfectadas con el plásmido de MBNL1 en comparación con las transfectadas con el plásmido vacío (**figura 13C**).

En los resultados del análisis por *Western Blot* de los marcadores de CSC se observó un mayor nivel de ALDH1, CD44, SOX2, OCT4 y NANOG en las condiciones experimentales con MBNL1 silenciado respecto al control en las líneas celulares MDA-MB-436 y MDA-MB-231, mientras que las células con sobreexpresión de MBNL1 en la línea celular MDA-MB-231R mostraron resultados opuestos, es decir, una menor expresión de estos marcadores respecto al control (**figura 13D-F**). Cabe destacar que la proteína CD24 solo mostró una pequeña reducción en su expresión respecto al control en las condiciones transfectadas con los silenciadores de MBNL1 de la línea celular MDA-MB-436 (**figura 13D**). En el resto de las líneas celulares estudiadas no se observaron diferencias notables de expresión de esta proteína entre las condiciones experimentales.

Todo ello indicaba que el silenciamiento de MBNL1 favorecía el fenotipo de CSC con mayor potencial para la formación de colonias, mientras que la sobreexpresión se asociaba al efecto opuesto.

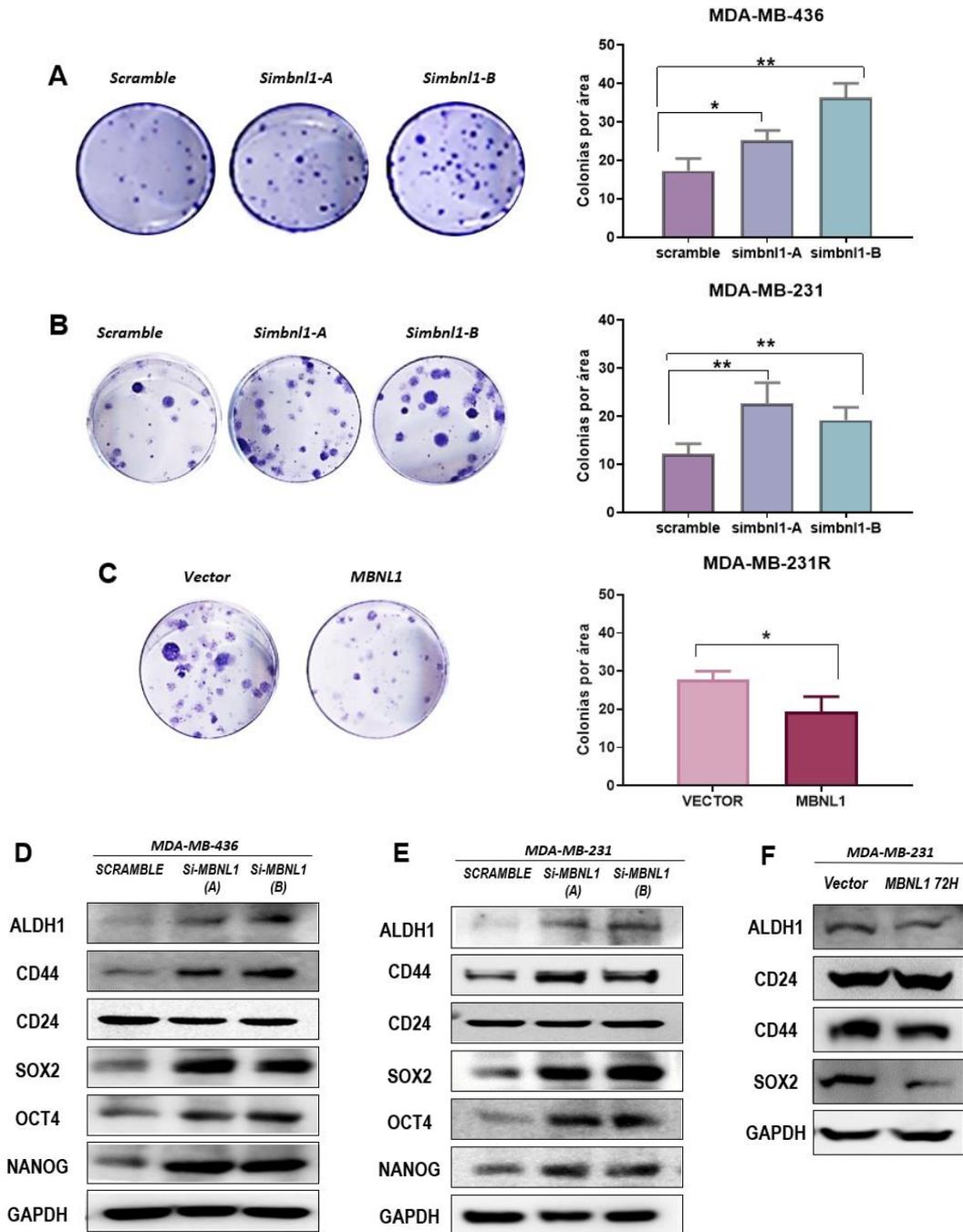


Figura 13. Efecto de la expresión de MBNL1 sobre la capacidad de formación de colonias y la expresión de marcadores de CSC. Imágenes representativas del ensayo de formación de colonias y valor promedio del número de colonias contabilizadas junto con la desviación estándar tras la pérdida de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-436 (A) y MDA-MB-231 (B) y tras la ganancia de función en la línea celular MDA-MB-231R (C). Nivel de expresión de marcadores de CSC mediante *Western Blot* tras la pérdida de función de MBNL1 en las líneas celulares MDA-436 (D) y MDA-MB-231 (E) y tras la ganancia de función en la línea celular MDA-MB-231R (F), empleando GAPDH como control endógeno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

4.3. Correlación entre la expresión de *MBNL1* y la supervivencia libre de metástasis en pacientes de cáncer de mama triple negativo

Con el objetivo de validar en una cohorte de pacientes los datos obtenidos en experimentos *in vitro* con líneas celulares, se analizó la correlación entre la expresión de *MBNL1* a nivel de ARNm en muestras de tejido tumoral de pacientes de CMTN y la supervivencia libre de metástasis (DMFS, por sus siglas en inglés). Para ello, se realizó un análisis *in-silico* de bases de datos públicas mediante el software Kaplan Meier Plotter (Gyorffy *et al.*, 2010).

Los resultados mostraron una correlación significativa (logrank $p=0.0018$, Hazard ratio 0,57, 95% CI 0,4-0,81) entre la sobreexpresión de *MBNL1* y el tiempo de supervivencia libre de metástasis (**Figura 14**). Según estos datos, las pacientes con mayor expresión de *MBNL1* en el tejido tumoral presentan una DMFS media de 45,6 meses, en comparación con los 23,5 meses en aquellos pacientes con niveles bajos de *MBNL1*.

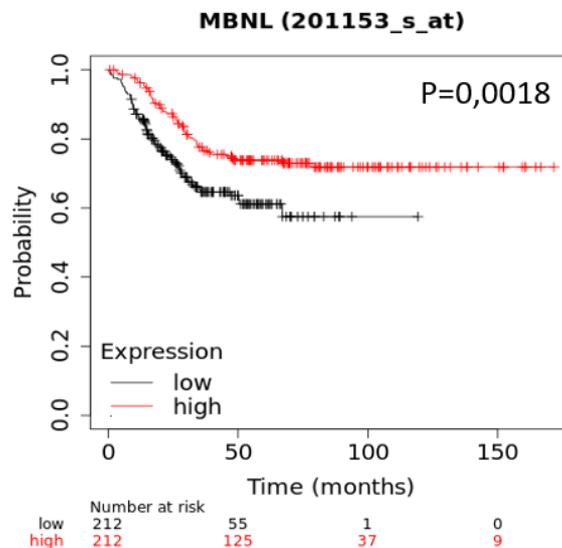


Figura 14. Curva Kaplan Meier de DMFS en función del nivel de expresión de *MBNL1* en tejido tumoral de pacientes de CMTN. Se consideró el valor de la mediana de la expresión de *MBNL1* como punto de corte para clasificar a las pacientes entre nivel alto (rojo) y bajo (negro) de *MBNL1*. N=224.

5. DISCUSIÓN

Se estima que la metástasis representa más del 90% de las muertes entre los pacientes con tumores sólidos en todo el mundo (Riggio *et al.*, 2021). Dentro de los diferentes subtipos de cáncer de mama, las células de CMTN son constitutivamente más invasivas y, por tanto, muestran una alta probabilidad de producir la enfermedad metastásica, lo que supone un peor pronóstico (Wu *et al.*, 2016). Un factor esencial para el inicio de la metástasis es que las células cancerosas deben adquirir un fenotipo mesenquimal que permita la migración a órganos distantes (Martin *et al.*, 2013); de este modo la EMT se ha convertido en un importante foco de investigación. Al mismo tiempo, numerosos estudios han identificado un subconjunto minoritario de células tumorales, las CSCs, con un mayor potencial para adquirir estos rasgos fenotípicos que favorecen la migración e invasión de otros tejidos, junto con la capacidad de autorrenovarse y regenerar tumores (Guo, 2014). Durante todos estos procesos transitorios y adaptativos, las células tumorales experimentan alteraciones en la expresión génica, por lo que los mecanismos que impulsan dichos cambios de expresión constituyen un enfoque de gran interés para la investigación de futuras terapias. Los niveles de expresión génica no dependen solamente del nivel de transcripción del ADN, sino también del procesamiento y regulación postranscripcional de la estabilidad y expresión del ARNm (Corbett, 2018). Los microARNs y las RBP son dos clases importantes de moléculas que actúan como reguladores postranscripcionales. Sin embargo, mientras que el papel de los microARNs ha sido muy estudiado en el desarrollo y progresión del CMTN (Sabit *et al.*, 2020), el papel de las RBP en este subtipo de cáncer sigue siendo poco conocido. En este trabajo se ha estudiado el papel de MBNL1, una RBP involucrada en la patogénesis de la distrofia miotónica, en el desarrollo de metástasis en CMTN mediante experimentos *in vitro*.

Como punto de partida de este estudio, se observó que la línea celular MDA-MB-231R con resistencia generada a doxorubicina había adquirido propiedades del fenotipo mesenquimal, incrementando así su capacidad de migración e invasión respecto a la línea MDA-MB-231. Además, esta línea celular presentaba mayor expresión de marcadores de CSC y, en concordancia, mayor capacidad para formar colonias. Estas características convierten a la línea MDA-MB-231R en un modelo de CMTN con mayor potencial metastásico y, por tanto, más agresiva, que su línea parental MDA-MB-231.

Puesto que en los últimos años se ha relacionado la menor expresión de MBNL1 con la progresión tumoral y metástasis en varios tipos de cáncer como el glioblastoma (Voss *et al.*, 2021), cáncer cervical (Wang *et al.*, 2019), cáncer de próstata (Tabaglio *et al.*, 2018) y, también, cáncer de mama (Fish *et al.*, 2016), se comparó su nivel de expresión entre las líneas MDA-MB-231 resistente y *wild-type*. En conformidad con los resultados de los estudios mencionados anteriormente, la línea resistente, que había presentado un aumento en las propiedades mesenquimales y de CSC, contó también con una menor expresión de MBNL1, sugiriendo que dicha proteína podía tener un papel determinante en la adquisición de un fenotipo metastásico en CMTN.

A continuación, al inducir una pérdida de función de MBNL1, nuestros resultados revelaron que las células mejoraban su capacidad de migración e invasión, así como su potencial clonogénico, mientras que la ganancia de función de MBNL1 disminuyó estas propiedades hacia las de un fenotipo más epitelial y de célula diferenciada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fish *et al.* y Ray *et al.* en dos estudios diferentes en los que emplean líneas de CMTN. Fish *et al.* demostraron que MBNL1 suprime la invasión y la migración transendotelial a nivel funcional mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* y observaron un aumento de la expresión de VIM tras la pérdida de función de MBNL1 *in vivo* (Fish *et al.*, 2016). Estos resultados se ven respaldados por los observados en este trabajo, donde, además de vimentina, se han estudiado todos los marcadores de EMT (FN1, VIM, SNAIL1, CTNNB1, CD2/CDH1) y se ha demostrado que la pérdida de función de MBNL1 produce una variación en la expresión de estos genes que conduce a un fenotipo mesenquimal, mientras que la ganancia de función da lugar a un fenotipo epitelial. Merece la pena destacar el efecto de MBNL1 sobre la expresión de CDH1 (E-Cadherina) y CDH2 (N-Cadherina), ya que durante la EMT en cáncer, la N-cadherina se regula al alza mientras que la E-cadherina se regula a la baja y este "cambio de cadherina" se asocia con rasgos migratorios e invasivos mejorados (Loh *et al.*, 2019). Por otro lado, Ray *et al.* también demostraron que la pérdida de función de MBNL1 genera una mayor capacidad de formación de colonias, en ensayos *in vitro*, y da lugar a tumores más grandes en ensayos *in vivo*. Además, observaron una sobreexpresión de marcadores de CSCs (CD133) y de pluripotencia (SOX2, OCT4 y NANOG) (Ray *et al.*, 2020). En el presente trabajo, además, se ha estudiado el efecto de MBNL1 sobre la expresión de los marcadores específicos de BCSCs: ALDH1⁺, CD44⁺, CD24^{-bajo}, concluyendo que MBNL1 no sólo

modula los marcadores de pluripotencia generales, sino también los característicos de BCSCs.

Por otro lado, observamos como la pérdida de función de MBNL1 generó una menor capacidad proliferativa. El efecto opuesto observado entre proliferación y migración e invasión apoya la idea de que las células con fenotipo mesenquimal, más invasivo, se encuentran en un estado proliferativo más inactivo o quiescente, mientras que las de tipo epitelial tienen una mayor capacidad de proliferación (Wu *et al.*, 2016). De hecho, la mayoría de las terapias convencionales antiproliferativas no consiguen eliminar las células de carcinoma que han entrado en el estado de CSC mediante la activación del programa EMT, lo que produce una alta frecuencia de recaídas de la enfermedad (Shibue and Weinberg, 2017). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto al efecto de MBNL1 en la proliferación; los resultados de Fish *et al.* muestran una menor proliferación *in vitro* y tamaño de tumor *in vivo* en las líneas celulares con silenciamiento de MBNL1, de acuerdo con los resultados de nuestro trabajo. En cambio, en el estudio de Ray *et al.*, observan un mayor tamaño del tumor en los ensayos *in vivo* tras silenciar MBNL1. Este resultado puede deberse al efecto opuesto de MBNL1 sobre la proliferación y la capacidad de formación de colonias, dado que la generación del tumor en el ratón tras la inyección de las células depende de ambos factores. Ensayos *in vivo* con nuestro modelo de pérdida y ganancia de MBNL1 podrían ayudar a esclarecer estos resultados.

De acuerdo con todo lo anterior, nuestros resultados apoyan la teoría de que las células que inician la metástasis pueden originarse en células epiteliales que experimentan una EMT y adquieren un fenotipo de CSC debido a la regulación de un conjunto de genes por parte de las RBP, entre otras moléculas. (Mani *et al.*, 2008; Espinoza and Miele, 2013; Sosa *et al.*, 2014). Finalmente, estas células serán capaces de generar un nuevo tumor en el nicho metastásico a través de una MET causada por nuevos cambios en la expresión génica que conducen a la represión de rasgos mesenquimales y la reexpresión de marcadores epiteliales como E-cadherina (Dongre and Weinberg, 2019).

Cabe destacar que los resultados obtenidos *in vitro* en este trabajo se han validado en muestras de pacientes de CMTN, permitiendo un enfoque más traslacional. El análisis *in silico* de bases de datos públicas reveló una correlación positiva entre una mayor expresión de *MBNL1* en el tejido tumoral primario y un mayor tiempo de supervivencia

libre de metástasis, lo que pone de manifiesto el valor de *MBNL1* como biomarcador pronóstico en CMTN.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, apoyados por estudios anteriores, proponemos que la pérdida de *MBNL1* promueve un fenotipo mesenquimal y de CSC, favoreciendo la progresión metastásica en CMTN. Cabe resaltar la relevancia de este estudio, ya que los resultados obtenidos en modelos *in vitro* se han validado en muestras de pacientes de CMTN.

En los últimos años, las RBPs han sido consideradas como dianas moleculares potenciales para el tratamiento y diagnóstico tumoral (Espinoza and Miele, 2013). Dado que la sobreexpresión de *MBNL1* en líneas de CMTN ha mostrado un efecto positivo, disminuyendo la progresión metastásica, *MBNL1* podría convertirse en una diana potencial para la prevención y tratamiento de la metástasis en CMTN. Por ello, los mecanismos subyacentes que dirigen la regulación de la expresión de los genes diana de *MBNL1* implicados en metástasis merecen una mayor investigación. Asimismo, el potencial de *MBNL1* como marcador pronóstico en CMTN deberá ser validado en cohortes de pacientes de centros independientes para obtener resultados más robustos.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se han obtenido tras la realización de este trabajo son las siguientes:

1. La línea celular de CMTN MDA-MB-231R presenta un fenotipo más mesenquimal y de CSC, así como una menor expresión de MBNL1 que su línea celular parental MDA-MB-231.
2. La pérdida de función de MBNL1 se correlaciona con una menor capacidad de proliferación celular y expresión del marcador de ciclo celular CCNE2, y viceversa.
3. La pérdida de función de MBNL1 se correlaciona con una mayor capacidad de migración e invasión y expresión de marcadores de EMT, y viceversa.
4. La pérdida de función de MBNL1 se correlaciona con una mayor capacidad de formación y expresión de marcadores de BCSC, y viceversa.
5. La mayor expresión de *MBNL1* en tejido tumoral primario se correlaciona con una mayor supervivencia libre de metástasis en pacientes con CMTN.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Hajj, M. *et al.* (2003) 'Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp. 3983–3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100.

American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020*. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2019.

Bai, X. *et al.* (2018) 'Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance', *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier, 69(March), pp. 152–163. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.004.

Baralle, F. E. and Giudice, J. (2017) 'Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 18(7), pp. 437–451. doi: 10.1038/nrm.2017.27.

Bianchini, G. *et al.* (2016) 'Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 674–690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.

Bozorgi, A., Khazaei, M. and Khazaei, M. R. (2015) 'New findings on breast cancer stem cells: A review', *Journal of Breast Cancer*. Korean Breast Cancer Society, pp. 303–312. doi: 10.4048/jbc.2015.18.4.303.

Carey, L. A. *et al.* (2007) 'The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes', *Clinical Cancer Research*, 13(8), pp. 2329–2334. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1109.

Clara, J. A. *et al.* (2020) 'Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells — a clinical update', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 17(April). doi: 10.1038/s41571-019-0293-2.

Corbett, A. H. (2018) 'Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 52, pp. 96–104. doi: 10.1016/j.ceb.2018.02.011.

Denkert, C. *et al.* (2017) 'Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 389(10087), pp. 2430–2442. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32454-0.

Dongre, A. and Weinberg, R. A. (2019) 'New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 20(February). doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.

Eroles, P. *et al.* (2012) 'Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways', *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier Ltd, 38(6), pp. 698–707. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005.

Espinoza, I. and Miele, L. (2013) 'Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells', *CANCER LETTERS*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.027.

Fish, L. et al. (2016) 'Muscleblind-like 1 suppresses breast cancer metastatic colonization and stabilizes metastasis suppressor transcripts', *Genes and Development*, 30(4), pp. 386–398. doi: 10.1101/gad.270645.115.

Gates, D. P., Coonrod, L. A. and Berglund, J. A. (2011) 'Autoregulated Splicing of muscleblind -like 1 (MBNL1)', 286(39), pp. 34224–34233. doi: 10.1074/jbc.M111.236547.

Giuliano, A. E. et al. (2017) 'Breast Cancer — Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual', 00(0). doi: 10.3322/caac.21393.

Guo, W. (2014) 'Concise Review: Breast Cancer Stem Cells: Regulatory Networks, Stem Cell Niches, and Disease Relevance', *STEM CELLS Translational Medicine*, 3(8), pp. 942–948. doi: 10.5966/sctm.2014-0020.

Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients, *Breast Cancer Res Treatment*, 2010 Oct;123(3):725-31.

Harbeck, N. et al. (2019) Breast cancer, *Nature Reviews Disease Primers*. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.

Independent UK Panel on Breast Cancer Screening (2012) 'The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 380(9855), pp. 1778–1786. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61611-0.

Kanadia, R. N. et al. (2003) 'A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy', 302(December), pp. 1978–1981.

Loh, Chai, Tang, Wong, Sethi, Shanmugam, Chong, L. (2019) 'The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges'. *Cells*. doi: doi:10.3390/cells8101118.

Luo, M., Clouthier, Shawn G., et al. (2015) 'Breast cancer stem cells: Current advances and clinical implications', *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 1293, pp. 1–49. doi: 10.1007/978-1-4939-2519-3_1.

Mani, S. A. et al. (2008) 'The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells', pp. 704–715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.

Martin, T. A. et al. (2013) 'Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective', *Metastatic cancer: clinical and biological perspectives*, 1(January), pp. 135–168. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/?report=reader>.

Mendoza-Almanza, G. et al. (2020) 'Role of platelets and breast cancer stem cells in metastasis', *World Journal of Stem Cells*, 12(11), pp. 1237–1254. doi: 10.4252/wjsc.v12.i11.1237.

Miller, K. D. et al. (2019) 'Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2019', 69(5), pp. 363–385. doi: 10.3322/caac.21565.

Najafi, M. (2018) 'Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy', (October). doi: 10.1002/jcp.27740.

National Cancer Institute, 2015. Cancer Staging. Accessed at <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging> on June 1, 2021.

Pascual, M *et al.* (2006) 'The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing', pp. 65–80. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x.

Perou, C. M. *et al.* (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', 533(May), pp. 747–752.

Ray, D. *et al.* (2020) 'A tumor-associated splice-isoform of MAP2K7 drives dedifferentiation in MBNL1-low cancers via JNK activation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), pp. 16391–16400. doi: 10.1073/pnas.2002499117.

Riggio, A. I., Varley, K. E. and Welm, A. L. (2021) 'The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer', *British Journal of Cancer*. Springer US, (July 2020). doi: 10.1038/s41416-020-01161-4.

Sabit, H. *et al.* (2020) 'Triple Negative Breast Cancer in the Era of miRNA', *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, p. 103196. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103196.

Senkus, E. *et al.* (2015) 'Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*. Elsevier Masson SAS, 26(Supplement 5), pp. v8–v30. doi: 10.1093/annonc/mdv298.

Shibue, T. and Weinberg, R. A. (2017) 'EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), pp. 611–629. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.

Sosa, M. S., Bragado, P. and Aguirre-ghiso, J. A. (2014) 'Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 14(9), pp. 611–622. doi: 10.1038/nrc3793.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 0(0), pp. 1–41. doi: 10.3322/caac.21660.

Tang, L., Zhao, P. and Kong, D. (2019) 'Muscleblind-like 1 destabilizes Snail mRNA and suppresses the metastasis of colorectal cancer cells via the Snail/E-cadherin axis', *International Journal of Oncology*, 54(3), pp. 955–965. doi: 10.3892/ijo.2019.4691.

Thornton, C. A., Wang, E. and Carrell, E. M. (2017) 'Myotonic dystrophy: approach to therapy', *Current Opinion in Genetics & Development*. Elsevier Ltd, 44(Dm), pp. 135–140. doi: 10.1016/j.gde.2017.03.007.

Voss, D. M. *et al.* (2021) 'The alternative splicing factor, MBNL1, inhibits glioblastoma tumor initiation and progression by reducing hypoxia-induced stemness', *Cancer Research*, 80(21), pp. 4681–4692. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1233.

Wang, T., Liu, Q. and Duan, L. (2019) 'MBNL1 regulates resistance of HeLa cells to cisplatin via Nrf2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, (xxxx), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.162.

World Health Organization (2021) Breast cancer. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.

Wu, Y., Sarkissyan, M. and Vadgama, J. (2016) 'Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer', *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), p. 13. doi: 10.3390/jcm5020013.

Yao, H. et al. (2017) 'Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon?', *Oncotarget*, 8(1), pp. 1913–1924. doi: 10.18632/oncotarget.12284.

Zhang, X., Powell, K. and Li, L. (2020) 'Breast cancer stem cells: Biomarkers, identification and isolation methods, regulating mechanisms, cellular origin, and beyond', *Cancers*. MDPI AG, pp. 1–28. doi: 10.3390/cancers12123765.