

DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA SUPERAR LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTITUMORALES

DEVELOPMENT OF NOVEL STRATEGIES TO OVERCOME RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS

Miriam Nuncia-Cantarero¹, David Tébar-García^{1,2}, Raquel López-Rosa^{1,2}, María del Mar Noblejas-López^{1,2}, Cristina Nieto-Jiménez⁵, Leticia Serrano-Oviedo², Esther Sánchez-López³, Ana Sanchez-Mozo³, Rosa Barbella Aponte⁴, Virginia Adamoli⁴, Monica Gómez-Juarez², Alberto Ocaña^{2,5} y Eva M. Galán-Moya^{1,2,6*}

¹ Regional Centre for Biomedical Research, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain.

² Translational Research Unit, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

³ Surgery Department, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

⁴ Anatomic Pathology Service, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

⁵ Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain. ⁶ Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

Desde hace décadas, la quimioterapia ha sido el tratamiento farmacológico estándar para la mayoría de los pacientes oncológicos. Sin embargo, aunque la respuesta inicial al tratamiento es buena, los pacientes suelen acabar desarrollando resistencias que dificultan el manejo de la enfermedad, lo que urge a diseñar nuevas estrategias terapéuticas capaces de superar este problema. Las mejoras de las técnicas de secuenciación y análisis genético están cambiando la forma de abordar esta enfermedad. Estas nuevas tecnologías están permitiendo la identificación de nuevas dianas terapéuticas en numerosos tipos de cáncer.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) se caracteriza por la ausencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y del receptor HER2, lo que impide el uso de fármacos dirigidos a estas proteínas, que sí son efectivos en los otros subtipos de cáncer de mama. Hasta la fecha, las únicas drogas dirigidas aprobadas para el tratamiento del CMTN son los inhibidores de PARP, el olaparib y el talazoparib, pero solo para aquellas pacientes que presenten mutaciones en el gen *BRCA*, lo que ocurre solo en alrededor del 20% del total de pacientes diagnosticadas con esta enfermedad. Por ello, la quimioterapia es la única opción para la mayoría de las pacientes de CMTN.

En primera línea, los fármacos más utilizados son las antraciclínicas y los taxanos, y para aquellas pacientes que no responden, los quimioterápicos más usados son los platinos (cisplatino y carboplatino). En los últimos años, nuestro grupo ha desarrollado diferentes modelos *in vitro* de resistencia a quimioterapia, tanto intrínseca como adquirida, que nos han permitido, por un lado, identificar nuevos objetivos drogables en CMTN y, por otro lado, evaluar la acción anti-tumoral de compuestos dirigidos contra estos objetivos.

Usando tejido adiposo peritumoral fresco de pacientes de CMTN (CEIm 08/2017, GAI Albacete) y células tumorales de este subtipo (MDA-MB-231, BT549, HS578T y HCC3153), hemos diseñado modelos de resistencia intrínseca que mimetizan el microambiente tumoral *in vitro*. También se generaron modelos en 3D (tumoresferas) para recapitular mejor las características de la población de células madre tumorales quimio-resistentes presente en los tumores. Para el desarrollo de modelos de resistencia adquirida, las líneas tumorales fueron expuestas a concentraciones crecientes del quimioterápico (IC30-IC70) usando una estrategia de pulsos periódicos. Los modelos fueron caracterizados mediante qPCR usando un panel de marcadores. El impacto de los fármacos sobre las células tumorales fue evaluado *in vitro* mediante la técnica del MTT (proliferación), ensayos de clonogénicos (iniciación tumoral) y matrigel (invasión), y por citometría de flujo (muerte celular), demostrando la utilidad de estos modelos para evaluar respuesta a quimioterapia. Para evaluar el efecto *in vivo*, se usaron modelos ortotópicos en ratones inmunodeprimidos (BALB-nu).

Nuestros resultados sugieren varias opciones terapéuticas interesantes. Por un lado, hemos identificado un panel de marcadores que podría resultar de utilidad para estratificar a pacientes de CMTN, actuando como biomarcador de respuesta y de pronóstico de las pacientes. Por otro lado, hemos identificado nuevas dianas terapéuticas cuya inhibición farmacológica revierte o evita la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino, lo que puede tener relevancia terapéutica para aquellos pacientes que están siendo tratados con derivados del platino.

For decades, chemotherapy has been the standard drug treatment for most cancer patients. However, although the initial response is good, patients often end up developing resistance that hinders the management of the disease, which urges the design of new therapeutic strategies capable of overcoming this problem. Improvements in sequencing and genetic analysis techniques are changing the approach to this disease. These new technologies are allowing the identification of novel therapeutic targets in numerous types of cancer.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of hormone receptors (estrogen and progesterone) and the HER2 receptor, which precludes the use of drugs targeting these proteins, which are effective in the other breast cancer subtypes. To date, the only targeted drugs approved for the treatment of TNBC are PARP inhibitors, olaparib and talazoparib, but only for those patients with mutations in the *BRCA* gene, which occurs in only about 20% of all patients diagnosed with this disease. Chemotherapy is therefore the only option for most TNBC patients.

In the first line, the most commonly used drugs are anthracyclines and taxanes, and for those patients who do not respond, the most commonly used chemotherapeutics are platinum (cisplatin

and carboplatin). In recent years, our group has developed different *in vitro* models of resistance to chemotherapy, both intrinsic and acquired, which have allowed us, on the one hand, to identify new druggable targets in TNBC and, on the other hand, to evaluate the anti-tumor action of compounds directed against these targets.

Using fresh peritumoral adipose tissue from TNBC patients (CEIm 08/2017, GAI Albacete) and tumor cells of this subtype (MDA-MB-231, BT549, HS578T and HCC3153), we have designed intrinsic resistance models that mimic the tumor microenvironment *in vitro*. 3D models (tumorspheres) were also generated to better recapitulate the characteristics of the chemo-resistant tumor stem cell population present in tumors. For the development of acquired resistance models, tumor lines were exposed to increasing concentrations of the chemotherapeutic (IC30-IC70) using a periodic pulsing strategy. The models were characterized by qPCR using a panel of markers. The impact of the drugs on tumor cells was evaluated *in vitro* by MTT (proliferation), clonogenic (tumor initiation) and matrigel (invasion) assays, and by flow cytometry (cell death), demonstrating the usefulness of these models to evaluate response to chemotherapy. To evaluate the *in vivo* effect, orthotopic models were used in immunosuppressed mice (BALB-nu).

Our results suggest several interesting therapeutic options. On the one hand, we have identified a panel of markers that could be useful for stratifying TNBC patients, acting as a biomarker of patient response and prognosis. On the other hand, we have identified new therapeutic targets whose pharmacological inhibition reverses or prevents resistance to cisplatin-based chemotherapy, which may have therapeutic relevance for those patients being treated with platinum derivatives.

USO DE INHIBIDORES DE PROTEÍNAS BET PARA CONTROLAR LA RESISTENCIA ADQUIRIDA EN TUMORES MAMARIOS

USE OF BET PROTEIN INHIBITORS TO CONTROL ACQUIRED RESISTANCE IN MAMMARY TUMORS

David Tebar-García¹, Raquel López-Rosa¹, M^a del Mar Noblejas-Lopez^{1,2}, Miriam Nuncia-Cantarero¹, Cristina Nieto-Jimenez³, Miguel Burgos^{1,2}, Alberto Ocaña³, Eva M. Galan-Moya^{1,2,4*}

¹ Translational Oncology Laboratory, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla La Mancha, Albacete, Spain.

² Translational Research Unit, University Hospital, Albacete, Spain.

³ Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain.

⁴ Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

Introducción: El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es el subtipo de cáncer de mama que más heterogeneidad presenta debido en gran parte a una presencia elevada de células madre tumorales (CSC, del inglés *Cancer Stem Cells*). Además, este subtipo tumoral no presenta dianas terapéuticas específicas, lo que restringe su tratamiento a radioterapia y quimioterapia tradicional. Estos tratamientos afectan en gran medida a células tumorales normales, pero las CSC suelen presentar resistencia intrínseca a estos tratamientos. Por ese motivo, esta población celular se ve aumentada conforme los tumores adquieren resistencia al tratamiento.

Las proteínas BET son efectores epigenéticos conocidos por controlar la expresión de los marcadores de CSC y, por lo tanto, los inhibidores de BET (BETi), como JQ1, podrían ser una alternativa de tratamiento que controlase la población de CSC dentro del tumor y ayudase a revertir la quimiorresistencia. Como ocurre en las líneas parentales según datos publicados anteriormente en el laboratorio, donde JQ1 consigue reducir estos marcadores y por lo tanto, esta población se ve reducida.

Materiales y métodos: Para este trabajo, se generaron modelos celulares de resistencia a quimioterapia tradicional en células de TNBC. A través de estudios de qPCR se analizó la expresión de un panel de marcadores de CSC en las células generadas comparándolas con las líneas sensibles y se evaluó el impacto de JQ1 sobre dichos marcadores. También se realizaron ensayos de proliferación MTT, de progresión tumoral y de iniciación tumoral, a través de la formación de colonias, en células resistentes en respuesta a este BETi. La respuesta a este inhibidor sobre la apoptosis de la población de células resistentes fue evaluada mediante el análisis de unión de Anexina V por citometría de flujo.

Resultados: Las células TNBC con resistencia adquirida a la quimioterapia se observó un aumento de la expresión en marcadores de CSC. Al tratar las células con JQ1 se consiguió reducir la expresión de estos marcadores, a pesar encontrarse aumentados en el modelo resistente. Además, estos fármacos ralentizaron la proliferación celular y obstaculizaron la progresión tumoral de las células resistentes a la quimioterapia, evitando también la formación de colonias, lo que se traduce en una reducción de la recaída de estos tumores tras el tratamiento. La evaluación de la apoptosis confirmó que los BETi provocaron muerte celular en estos modelos. Todos estos resultados han sido estudiados en comparación con la línea sensible, donde no se puede observar una reducción de estas propiedades estudiadas.

Conclusiones: Los inhibidores de BET disminuyen los marcadores de CSCs en el TNBC, lo cual lo consigue mejor en el modelo resistente, a pesar de su sobreexpresión, consigue reducir además las propiedades de las CSC (proliferación, progresión e iniciación tumoral). Por ello, podría

constituir una buena estrategia para revertir la resistencia en tumores TNBC resistentes, como tratamiento único o en combinación con otros quimioterápicos.

Background: Triple negative breast cancer (TNBC) is the most heterogeneous breast cancer subtype due largely to a high presence of tumor stem cells (CSCs). Moreover, this tumor subtype has no specific therapeutic targets, which restricts its treatment to traditional radiotherapy and chemotherapy. These treatments largely affect normal tumor cells, but CSCs often show intrinsic resistance to these treatments. For this reason, this cell population is increased as tumors become resistant to treatment.

BET proteins are epigenetic effectors known to control the expression of CSC markers, and therefore BET inhibitors (BETi), such as JQ1, could be a treatment alternative that controls the CSC population within the tumor and helps reverse chemoresistance. As occurs in parental lines according to previously published data in the laboratory, where JQ1 manages to reduce these markers and therefore, this population is reduced.

Materials and methods: For this work, cellular models of resistance to traditional chemotherapy were generated in TNBC cells. Through qPCR studies, the expression of a panel of CSC markers in the generated cells was analyzed by comparing them with the sensitive lines and the impact of JQ1 on these markers was evaluated. MTT proliferation, tumor progression and tumor initiation assays, through colony formation, were also performed on resistant cells in response to this BETi. The response to this inhibitor on apoptosis of the resistant cell population was assessed by flow cytometry analysis of Annexin V binding.

Results: TNBC cells with acquired resistance to chemotherapy showed increased expression of CSC markers. Treating the cells with JQ1 reduced the expression of these markers, although they were increased in the resistant model. In addition, these drugs slowed cell proliferation and hindered tumor progression of chemotherapy-resistant cells, also preventing colony formation, which translates into a reduction in the relapse of these tumors after treatment. Apoptosis assessment confirmed that BETi caused cell death in these models. All these results have been studied in comparison with the sensitive line, where no reduction of these studied properties can be observed.

Conclusions: BET inhibitors decrease CSCs markers in TNBC, which is better achieved in the resistant model, despite their overexpression, and reduce CSCs properties (proliferation, progression, and tumor initiation). Therefore, it could be a good strategy to reverse resistance in resistant TNBC tumors, as a single treatment or in combination with another chemotherapeutics.

EL USO DE INHIBIDORES EPIGENÉTICOS POTENCIA EL EFECTO DE LA TEMOZOLAMIDA EN MODELOS 2D Y 3D DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

THE USE OF EPIGENETIC INHIBITORS ENHANCES THE EFFECT OF TEMOZOLOMIDE IN 2D AND 3D MODELS OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Raquel López-Rosa^{1,2}, David Tébar-García^{1,2}, María del Mar Noblejas-López^{1,2}, Miriam Nuncia-Cantarero², Cristina Nieto-Jiménez⁴, Éva M. Galán-Moya^{1,2,3*}

¹ Translational Research Unit, Albacete University Hospital, Albacete, Spain.

² Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain.

³ Nursery faculty, Castilla-La Mancha University (UCLM), Albacete, Spain.

⁴ Experimental Therapeutics Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos (HCSC), Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC) and CIBERONC, Madrid, Spain.

Introducción: El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor cerebral muy agresivo y para el que no existe un tratamiento eficaz. Actualmente, es el tumor cerebral más frecuente y la mediana de supervivencia es de 15 meses desde su diagnóstico. La resección quirúrgica completa es complicada, ya que son muy invasivos y suelen infiltrarse. El tratamiento habitual es la quimioterapia alquilante con temozolamida (TMZ). El 15% de los pacientes desarrollan resistencia adquirida al tratamiento estándar.

Se ha identificado una nueva población celular, las células iniciadoras del glioma (GICs), que son similares a las *Cancer Stem Cells* (CSCs). Las GICs muestran resistencia a las terapias estándar y son las principales responsables de la recurrencia. Por otro lado, las proteínas BET están implicadas en la transcripción, el ciclo celular o la inflamación y se relacionan con proteínas oncogénicas implicadas en el desarrollo de cáncer. Se ha demostrado que algunos inhibidores de proteínas BET son capaces de potenciar la actividad de la TMZ en GBM. Además, en trabajos previos del laboratorio se ha usado el inhibidor epigenético JQ1 en modelos 3D ricos en CSCs, ya que es capaz de inhibir algunos factores de transcripción implicados en ciclo celular, proliferación y metástasis. A su vez, ha demostrado un mayor efecto en los modelos más resistentes, coincidiendo con un elevado número de CSCs.

El objetivo de este trabajo será la evaluación de terapias alternativas que consigan evitar o combatir la resistencia adquirida a las terapias actuales producidas por las GICs.

Métodos: Se usaron las líneas celulares adherentes A172, T98, U87 y U118, así como los modelos 3D derivados de pacientes, GH2 y 12O12, los cuales, son ricos en GICs. Se llevaron a cabo ensayos de MTT, citometría de flujo y cristal violeta para evaluar la viabilidad celular en los modelos 2D tras la combinación de los inhibidores epigenéticos con

la TMZ. También ensayos de formación de esferas y dilución límite en los modelos 3D para evaluar el efecto de la combinación en las GICs.

Resultados: El uso de inhibidores epigenéticos mostró un efecto anti proliferativo similar en los diferentes modelos 2D empleados. Por otro lado, la combinación de inhibidores epigenéticos con el tratamiento estándar tuvo un potente efecto sinérgico, observándose un gran aumento de la muerte celular. A pesar de esto, el efecto fue más notable en aquellas líneas que mostraban una mayor resistencia intrínseca al tratamiento tradicional. Posteriormente, se pasó a la validación de los resultados en los modelos 3D, ya que presentan mayor resistencia a los tratamientos actuales y son más similares al paciente. En este caso, se observó un efecto sinérgico capaz de afectar a las GICs.

Conclusiones: El uso de una terapia combinada con inhibidores epigenéticos y el tratamiento estándar podría ser una buena alternativa terapéutica en glioblastoma multiforme.

Background: Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive brain tumor for which there is no effective treatment. It is currently the most common brain tumor, and the median survival time is 15 months from diagnosis. Complete surgical resection is complicated, as they are very invasive and tend to infiltrate. The usual treatment is alkylating chemotherapy with temozolomide (TMZ). 15% of patients develop acquired resistance to standard treatment.

A new cell population, glioma-initiating cells (GICs), which are like Cancer Stem Cells (CSCs), has been identified. GICs show resistance to standard therapies and are mainly responsible for recurrence. On the other hand, BET proteins are involved in transcription, cell cycle or inflammation, and are related to oncogenic proteins involved in cancer development. It has been shown that some BET protein inhibitors are able to enhance TMZ activity in GBM.

In addition, a previous work in the laboratory has used the epigenetic inhibitor JQ1 in 3D models, that are rich in CSCs, and it is able to inhibit some transcription factors involved in cell cycle, proliferation, and metastasis. It has shown a greater effect in resistant models, coinciding with a high number of CSCs.

The aim of this work will be to evaluate alternative therapies that can avoid or combat acquired resistance to current therapies produced by GICs.

Methods: The adherent cell lines A172, T98, U87, and U118, as well as the patient-derived 3D models GH2 and 12O12, which are rich in GICs, were used. MTT, flow cytometry and crystal violet assays were performed to evaluate cell viability in the 2D models after combination of epigenetic inhibitors with TMZ. Sphere formation and limit dilution assays were also performed in 3D models to assess the effect of the combination on GICs.

Results: The use of epigenetic inhibitors showed a similar anti-proliferative effect in the different 2D models used. On the other hand, the combination of epigenetic inhibitors with standard treatment had a synergistic effect, with an increase in cell death. Despite of, the effect was most notable in those lines that showed intrinsic resistance to the traditional treatment. Afterward, the results were validated in 3D models, which show greater resistance to current treatments, and they are like the patient. In this case, a synergistic effect was observed.

Conclusions: The use of a combined therapy with epigenetic inhibitors and standard treatment could be a good therapeutic alternative in glioblastoma multiforme.

RETOS EN CIRUGÍA DEL NERVIIO PERIFÉRICO. VISION DEL CIRUJANO

CHALLENGES IN PERIPHERAL NERVE SURGERY. THE SURGEON'S VIEW

Lara Cristóbal^{1,2}, Elena Armas¹, Elisa Sanz^{2,3}, Juan José Jover⁴, Jose Luis Fernandez-Cañamaque¹, Andrés A. Maldonado^{1,2,5}

¹ Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Cirugía Plástica, Hospital Universitario de Getafe.

² Universidad Europea de Madrid.

³ Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Neurofisiología, Hospital Universitario de Getafe.

⁴ Unidad de Nervio Periférico y Plexo Braquial, Servicio de Radiología, Hospital Universitario de Getafe.

⁵ Servicio de Cirugía Plástica, Reconstructiva y Mano, BG Trauma Center Frankfurt am Main.

Las lesiones de nervios periféricos son frecuentes y conllevan pérdida de funciones tales como sensibilidad o movilidad de las extremidades, además de dolor. Todo ello puede generar incapacidades permanentes, impactando de manera negativa en la calidad de vida de las personas. La cirugía de nervio periférico ha evolucionado significativamente en las últimas décadas y en la actualidad disponemos de un amplio espectro de técnicas reconstructivas para tratar este tipo de lesiones: injertos nerviosos, transferencias nerviosas, transferencias tendinosas, colgajos libres motorizados, además de la combinación con ortesis y prótesis mioeléctricas. Sin embargo, todavía existen una serie de factores que limitan las opciones reconstructivas: la degeneración muscular tras la lesión nerviosa, la velocidad de regeneración axonal o las secuelas y limitación de usar nervios donantes son tres retos a investigar en el futuro de este campo. Para poder afrontar estos retos a nivel biológico y combinarlos con las estrategias quirúrgicas actuales, creemos fundamental la colaboración entre la investigación básica y clínica.