



*Escuela Internacional de Doctorado*

BPTF COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL PROCESO  
DE QUIMIORRESISTENCIA E INMUNOMODULACIÓN EN EL  
ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

**Tesis doctoral**

Escuela Internacional de Doctorado

Universidad Francisco de Vitoria

Doctorado en Biotecnología, Medicina y Ciencias Biosanitarias

Raúl Muñoz Velasco

MADRID, 2024

**Director / Tutor:** Dr. Víctor Javier Sánchez-Arévalo Lobo  
Hospital 12 de Octubre, Patología Molecular  
Universidad Francisco de Vitoria, Instituto de Investigaciones Biosanitarias.



*A mi madre, padre, hermano y a ti Bea,  
esto es tan mío como vuestro*

## **Agradecimientos**

---

Antes de aventurarme en la tarea de desglosar mi lista de agradecimientos, quiero tomarme un momento para reconocer el 'equipo detrás de la tesis', ese grupo selecto de individuos que han sido mis héroes no reconocidos, mis proveedores de comida y, en algunos casos, mis comediantes personales. Sin más preámbulos, comencemos este viaje de agradecimientos que es, sin duda, el mejor crédito de cierre que podría tener este proyecto:

- A mi jefe, **Víctor**, gracias por la oportunidad aquel septiembre de 2019 de hacer las prácticas del máster y después la tesis en su laboratorio. Su orientación ha sido fundamental para el éxito de este proyecto y mi desarrollo profesional.
- A los actuales participantes de este nuestro laboratorio sin ir de más a menos importante. **David**, mi último fiel ayudante, tanto en el laboratorio, como de elegir jugadores para el Máster, al cual le dejo una buena papeleta con el CRISPR inducible. **Alejandra, Antonio** y sobre todo a **Germán**, al cual he llevado por la calle de la amargura con el RNA-seq, gracias por la ayuda aportada para algunas de las figuras que hubiera sido imposible de hacer por mi cuenta. **Ana**, 10 años de compañeros y amigos desde el primer día del grado, que han culminado con una tesis para los dos; gritos y cabreos durante la tesis que aun así no han conseguido cambiar nuestra relación. Toca separación, ya no estaré ahí para molestarte durante las mañanas, pero aun así te aseguro que seguiremos unidos. Por último, pero no menos importante, **María**, la hija más longeva que he tenido, tanto que ha decidido seguir los pasos y meterse a hacer el doctorado, un verdadero descubrimiento personal, que, aunque de pequeño tenía a escasos metros de mi colegio, ha sido durante los largos audios hablando de la Chip, donde he conocido a la verdadera María que siempre llevare conmigo.
- A los que ya no están en el laboratorio, pero marcaron un antes y después en él. La primera y de las más importantes de todos, **Ángela**, aunque también la más alborotadora, con la que más cervezas he podido tomar y sin duda una pieza clave día a día tanto profesional como personalmente. A **Lana**, quien siempre será parte de esos recuerdos imborrables de los meses que compartimos durante el máster, especialmente cuando trabajamos juntos en el laboratorio. No solo fuiste un compañero de estudios, sino que te convertiste en un verdadero amigo para mí. A **Sofía**, mi yo en mujer, pero un poco más desorganizada (y ya es decir), gracias por las limpiezas de chacas al laboratorio que permitieron que salieran los experimentos. A **Javi**, compañero leal y apasionado del Atleti y del

## Agradecimientos

Nano. Desde el primer día, hubo una conexión especial entre nosotros que hizo que los meses que pasaste en el laboratorio sean inolvidables. A **Alberto**, el primer bioinformático del grupo y que aun rodeado por gente que no tenía ni idea, consiguió llevarnos a Jupyter. **Marian**, nuestra fiel proveedora de bollos y bizcochos durante el doctorado, empezó con amor a la ciencia y ha acabado de concejala, lo mismo escogió el buen camino. Por último, a **Carmen**, gran ayuda durante esta tesis, gran oradora durante las comidas y que como era normal, nos abandonó para meterse en el arduo mundo de la ética.

- No puedo dejar de mencionar a una de las personas más importantes de estos años en el laboratorio: **Paula**. Pasamos de ser completos desconocidos en la universidad a ser fundamentales en el camino del otro. Has sido una compañera ejemplar, incluso en el tiempo relativamente corto que compartimos, y me has acompañado tanto en los mejores momentos como en los más difíciles durante esta tesis. Sé que siempre serás una de las estrellas que ilumina mi viaje, y te estoy profundamente agradecido por eso.
- Quiero no olvidarme de **JC**, amigo y ayudante con la citometría de la tesis al cual he visitado más veces en el IIB para pedirle ayuda que para verle, muchas gracias por todo JC.
- A todos y cada una de las personas que han pasado por el laboratorio durante estos años de arduo trabajo, sin vosotros hubiera sido complicado los madrugones
- Por último, a aquellos que han permitido la realización de la tesis como es a la UFV y al departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, en especial a **José Luis** y sobre todo a **Juan**, que, aunque durante varios meses me llamara Pablo, he encontrado en él un fiel amigo.

Por último, quiero dar gracias a los verdaderamente importantes en estos agradecimientos, aquellos que me han sufrido de todas las maneras posibles y me han hecho tirar adelante, mi familia y amigos:

- A mis amigos, gracias por ser el respiro que tanto necesitaba durante este proceso. Los fines de semana fueron justo lo que me hacía falta para desconectar de las largas horas de estudio y trabajo. Gracias por ayudarme a recargar energías y por estar ahí cuando más lo necesitaba.

- A mi hermano **Javier**, pieza fundamental en mi vida, que, aunque probablemente te sientas un poco perdido mientras defiendes mi tesis, quiero que sepas que este logro no es solo mío, sino también tuyo. Has estado a mi lado en todo momento, incluso cuando yo mismo dudaba. Tu apoyo ha sido de gran ayuda en este proceso. Gracias por todo, Javi. Este triunfo es nuestro, y no podría haberlo conseguido sin ti.
- A mis padres, quiero expresarles mi profundo agradecimiento por todo lo que han hecho por mí.
  - **Papá**, recuerdo que hace un poco más de 26 años me tenías en tus brazos mientras escuchábamos a mamá defender su tesis. Hoy, los papeles se han invertido, y gracias a los valores que me inculcaste desde pequeño, soy yo quien está aquí, frente a ti, presentando mi propia tesis doctoral.
  - **Mamá**, si estoy en esta posición, escribiendo estas palabras, es porque tú me enseñaste a amar la ciencia y a explorar el mundo con curiosidad. Me inculcaste el espíritu científico y me acompañaste en cada paso de este largo camino. Gracias por tu apoyo incondicional, por guiarme incluso cuando necesitaba una reprimenda, y por no dejarme rendir ante las dificultades. Siempre me animaste a seguir adelante, y este logro es, en gran parte, gracias a ti. Os quiero mucho y os agradezco por ser mis pilares en la vida.
- Por último, no puedo dejar de mencionar a mi fiel compañera de camino, **Bea**. ¿Qué puedo decirte? Has sido mi roca en los momentos más difíciles, aguantando con paciencia infinita mientras te contaba cada pequeño detalle de mis jornadas, por más rutinarios o caóticos que fueran. Gracias a ti, pude salir de la burbuja de estrés y ansiedad en la que me encontraba y recobrar la perspectiva cuando más lo necesitaba. Tu habilidad para escucharme y orientarme, ayudándome a mantenerme con los pies en la tierra, ha sido la luz que me ha guiado en el camino. Este trayecto ha sido una pieza crucial en el rompecabezas de nuestra historia personal, un rompecabezas que sigue creciendo y que estoy seguro de que juntos completaremos. Agradezco profundamente tu apoyo y me siento afortunado de tenerte a mi lado mientras avanzamos hacia lo que el futuro nos tiene preparado.
- Y al resto de mi familia que de una manera u otra han ayudado de manera indirecta a la tesis, gracias por todo.

# Índice

---



|   |           |
|---|-----------|
| <b>Lista de abreviaturas .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>1. Abstract.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2. Introducción.....</b>   | <b>25</b> |
| 2.1.    Epidemiología del adenocarcinoma ductal pancreático .....             | 27        |
| 2.2.    Modelo de desarrollo del ADP.....                                     | 27        |
| 2.3.    Papel del microbiente tumoral en ADP .....                            | 30        |
| 2.4.    Papel de la Inflamación en el ambiente tumoral en ADP.....            | 33        |
| 2.5.    Terapias en clínica asociadas al ADP .....                            | 36        |
| 2.6.    Uso de remodeladores de cromatina como diana terapéutica en ADP ..... | 37        |
| 2.7.    BPTF .....  | 38        |
| <b>3. Objetivos .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4. Material y métodos.....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1.    Líneas celulares .....  | 47        |
| 4.2.    Aislamiento de monocitos primarios.....                               | 47        |
| 4.3.    Generación de constructores (shARN y CRISPRi) .....                   | 48        |
| 4.4.    Producción de vectores virales. ....                                  | 49        |
| 4.5.    Ensayos celulares de proliferación celular y colonias .....           | 49        |
| 4.6.    Ensayos de migración celular .....                                    | 49        |
| 4.7.    Ensayo perfil de ciclo celular .....                                  | 50        |
| 4.8.    Ensayo de IC50 a gemcitabina .....                                    | 50        |
| 4.9.    Ensayo de Calcein-AM .....  | 51        |
| 4.10.    Experimentos de crecimiento tumoral en animales .....                | 51        |
| 4.11.    PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) .....                          | 52        |
| 4.12.    Chip-qPCR .....  | 52        |
| 4.13.    Inmunofluorescencia (IF) .....                                       | 53        |
| 4.14.    Tratamiento con TNF- $\alpha$ .....                                  | 53        |

## Índice

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.15.     | Estudio del perfil proteico secretorio (Array citoquinas) .....  | 53        |
| 4.16.     | Análisis de los niveles de secreción de IL1 $\alpha$ .....   | 54        |
| 4.17.     | Análisis de las poblaciones de macrófagos .....  | 54        |
| 4.18.     | Western Blot (WB) .....  | 54        |
| 4.19.     | Co-inmunoprecipitación .....   | 55        |
| 4.20.     | Inmunohistoquímica (IHC) .....   | 56        |
| 4.21.     | Análisis bioinformático de transportadores ABC .....   | 56        |
| 4.22.     | Reducción dimensional y clústering .....   | 56        |
| 4.23.     | Análisis WGCNA .....   | 56        |
| 4.24.     | Deconvolución de células inmunes .....   | 56        |
| 4.25.     | RNA-seq .....  | 56        |
| 4.26.     | Análisis estadístico .....   | 59        |
| <b>5.</b> | <b>Resultados.....</b>   | <b>61</b> |
| 5.1.      | BPTF se encuentra sobre expresado en ADP. ....   | 63        |
| 5.2.      | BPTF es necesario para la proliferación en ADP. ....   | 64        |
| 5.2.1.    | Inhibición de BPTF por CRISPRi en modelo singénico de ratón (KPC-CHX) .....                              | 64        |
| 5.2.2.    | Inhibición de BPTF por CRISPRi en ADP humano.....  | 66        |
| 5.2.3.    | Inhibición de BPTF por shRNA. ....   | 69        |
| 5.3.      | BPTF es necesario para la migración en ADP. ....   | 70        |
| 5.4.      | El silenciamiento de BPTF sensibiliza a las células a gemcitabina.....                                   | 73        |
| 5.5.      | BPTF es necesario para la expresión de los transportadores ABC .....                                     | 76        |
| 5.6.      | El silenciamiento de BPTF aumenta la retención de calceina intracelular. ....                            | 79        |
| 5.7.      | La delección de BPTF produce un aumento de daño al ADN. ....   | 80        |
| 5.8.      | La inhibición de BPTF acentúa el efecto de la gemcitabina. ....  | 84        |
| 5.9.      | La terapia combinada de inhibidores de PARP, gemcitabina y delección de BPTF aumenta el daño al ADN..... | 86        |
| 5.10.     | BPTF es necesario para la expresión de citoquinas inflamatorias humanas.....                             | 88        |
| 5.11.     | Papel del microambiente tumoral en ADP.....  | 92        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.12.     | BPTF regula la expresión de las citoquinas de la ruta de NF $\kappa$ B.....                       | 94         |
| 5.13.     | El silenciamiento de BPTF condiciona la polarización de macrófagos humanos el fenotipo (M2) ..... | 101        |
| <b>6.</b> | <b>Conclusiones .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>7.</b> | <b>Discusión .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>8.</b> | <b>Bibliografía .....</b>   | <b>123</b> |
| <b>9.</b> | <b>Anexos.....</b>  | <b>139</b> |
| 9.1.      | Figura Suplementaria 1.....   | 139        |
| 9.2.      | Figura Suplementaria 2.....   | 142        |
| 9.3.      | Figura Suplementaria 3.....   | 143        |
| 9.4.      | Figura Suplementaria 4.....   | 143        |
| 9.5.      | Figura Suplementaria 5.....   | 143        |
| 9.6.      | Tabla suplementaria 1 .....   | 146        |



## **Lista abreviaturas**

---



**A:**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADP: Adenocarcinoma ductal pancreático.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

**B:**

BPTF: Bromodomain PHD Finger Transcription Factor

BMDM: Macrófagos derivados de médula de ratón

**C:**

CAFs: Fibroblastos asociados a tumor

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

c-MYC: Myc celular

Co-iP: co-inmunoprecipitación

**D:**

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**E:**

EMT: Microambiente tumoral

**F:**

FBS: Suero Fetal Bovino

**G:**

GSEA: Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos Genéticos

GFP: Green fluorescent protein.

**H:**

H3Ac: Histone H3 Acetylation.

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3

H3K9me: Metilación de la lisina 9 de la histona 3

H3K79me: Metilación de la lisina 79 de la histona 3

H4K16Ac: Acetilación de la lisina 16 de la histone 4

**I:**

IL1 $\alpha$ : Interleuquina 1 alpha

IL1 $\beta$ : Interleuquina 1 beta

IL6: Interleuquina 6.

IHC: Inmunohistoquímica

## Lista de abreviaturas

### **M:**

MDSCs: Myeloid-derived suppressor cells.

MDR: Resistencia a medicamentos.

### **N:**

NFκB: Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells.

NK: Natural killer.

NURF: Factor de remodelación de nucleosomas dependiente de ATP

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

### **P:**

PanINs: Neoplasia intraepithelial pancreática.

PCA: Análisis de Componentes Principales

PSCs: Pancreatic stellate cells.

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato

### **R:**

RT: Temperatura ambiente

### **S:**

SCR: Control scramble.

shRNA: Short hairpin ARN.

### **T:**

TAMs: Macrófagos asociados a tumor

TANs: Neutrófilos asociados a tumor

TME: Microambiente tumoral

TNFα: Tumor necrosis factor.

TP53: Tumor protein 53.

Treg: Células T reguladoras.

TSS: Lugar de inicio de la transcripción

TILs: Linfocitos infiltrantes del tumor

### **V:**

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

## **Abstract**

---



El adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) es una enfermedad con un porcentaje de supervivencia inferior al 13%, constituyéndose como la séptima causa de muerte relacionada con cáncer. Su baja tasa de supervivencia se atribuye, en gran medida, a la detección tardía, cuando el tumor ya ha desarrollado resistencia a la quimioterapia y presenta una baja respuesta inmune. Este fenómeno se ha relacionado con la aparición de un denso estroma fibroso y por la presencia de poblaciones inmunes inmunosupresoras, como linfocitos T reguladores y macrófagos M2. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que permitan el tratamiento de la enfermedad es una necesidad urgente en la actualidad. En este estudio, se describe el papel del remodelador de la cromatina BPTF (Bromodomain PHD Finger Transcription Factor) como diana terapéutica en el ADP. El silenciamiento de BPTF redujo drásticamente la proliferación celular y la migración *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares de ADP humanas y murinas. Además, el silenciamiento de BPTF redujo la IC50 a gemcitabina mejorando su efecto terapéutico *in vivo*. Mecánicamente, BPTF es necesario para el reclutamiento de c-MYC en el promotor del transportador ABC y su inhibición facilita la acumulación de gemcitabina en las células tumorales, aumentando el daño en el ADN y mejorando el efecto terapéutico de la gemcitabina en combinación con inhibidores de las rutas de reparación. Además de esto, se demostró como BPTF regula la expresión de ciertas citoquinas y quimiocinas inflamatorias, necesarias para la polarización de poblaciones inmunes entre las que cabe a destacar los macrófagos, donde, la inhibición de BPTF redujo su polarización al fenotipo protumoral M2. Este estudio ha demostrado la capacidad de BPTF para regular la proliferación, quimiorresistencia y la remodelación del microambiente tumoral en el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP). Estos hallazgos sugieren que BPTF podría considerarse como una nueva potencial diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

**Palabras clave:** ADP, páncreas, BPTF, proliferación, quimiorresistencia, inmunosupresión, microambiente tumoral.

## Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a disease with a survival rate of less than 13%, making it the seventh leading cause of cancer-related death. Its low survival rate is largely attributed to late detection when the tumor has already developed resistance to chemotherapy and has a low immune response. This phenomenon has been related to the appearance of a dense fibrous stroma and the presence of immunosuppressive immune populations, such as regulatory T lymphocytes and M2 macrophages. Therefore, the search for new therapeutic targets that allow the treatment of the disease is an urgent need at present. In this study, we describe the role of the chromatin remodeler BPTF (Bromodomain PHD Finger Transcription Factor) as a therapeutic target in ADP. Silencing of BPTF dramatically reduced cell proliferation and migration in vitro and in vivo in human and murine ADP cell lines. Furthermore, BPTF silencing reduced the IC50 to gemcitabine enhancing its therapeutic effect in vivo. Mechanistically, BPTF is required for the recruitment of c-MYC to the ABC transporter promoter and its inhibition facilitates the accumulation of gemcitabine in tumor cells, increasing DNA damage and enhancing the therapeutic effect of gemcitabine in combination with repair pathway inhibitors. In addition, it was demonstrated how BPTF regulates the expression of certain inflammatory cytokines and chemokines, necessary for the polarization of immune populations including macrophages, where BPTF inhibition reduced their polarization to the M2 protumoral phenotype. This study has demonstrated the ability of BPTF to regulate proliferation, chemoresistance and remodeling of the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). These findings suggest that BPTF could be considered as a new potential therapeutic target for the treatment of this disease.

**Key words:** PDAC, pancreas, BPTF, proliferation, chemoresistance, immunosuppression, tumor microenvironment.

# Introducción

---



- **Epidemiología del adenocarcinoma ductal pancreático**

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es una enfermedad con una tasa de supervivencia inferior al 13% (Siegel RL et al., 2024), este subtipo de cáncer está asociado al 85% de todos los casos de cáncer de páncreas (Luo et al., 2019), siendo uno de los tumores con mayor tasa de mortalidad, además de presentar un aumento de porcentaje de casos en mujeres respecto a hombres (Siegel et al., 2021). La alta mortalidad se debe principalmente a su diagnóstico tardío, en la mayoría de los casos cuando se encuentra en estadios ya avanzados y a su alta quimiorresistencia, tanto intrínseca, por la expresión de proteínas asociadas a la resistencia a medicamentos (MDR), como adquirida, debido a la reacción desmoplásica formando un estroma que rodea a las células tumorales. Los principales responsables de la formación de este estroma son los fibroblastos asociados a tumor (CAFs), encargados de la producción de moléculas como colágeno, proteoglicanos y factores de crecimiento que dificultarán el acceso del quimioterápico. Además de los CAFs, se encuentran presentes células del sistema inmune, tanto del linaje linfocítico como mielocítico, que favorecerán un ambiente pro-tumoral (Feig et al., 2012; Vaish et al., 2021; Zhan et al., 2017). Debido al denso estroma y al microambiente tumoral presente, el único tratamiento efectivo hoy en día consiste en la resección quirúrgica, seguido de un tratamiento neoadyuvante con protocolos basados en gemcitabina, gemcitabina con capecitabina o 5-Fluoruracilo y FOLFIRINOX (oxaliplatino, irinotecán con leucovorina e infusión de corta duración de 5-FU). (Vera et al., 2016)

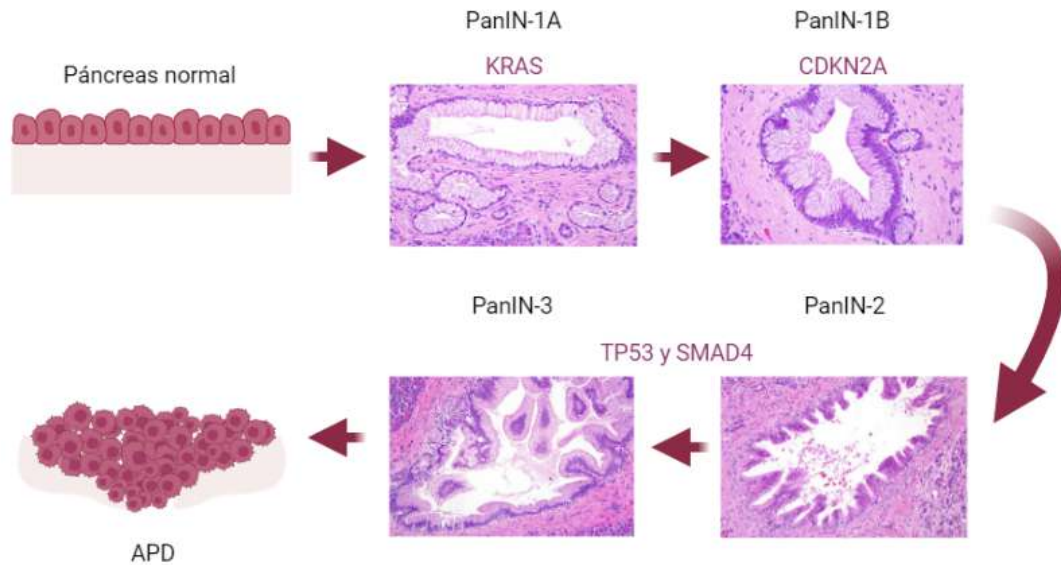
- **Modelo de desarrollo del ADP**

El páncreas es un órgano con doble función, por un lado, desempeña un papel en la digestión como órgano exocrino y, por otro lado, actúa como un órgano endocrino, liberando hormonas en el torrente sanguíneo. La parte exocrina del páncreas se compone de dos tipos de células: las células acinares, responsables de producir enzimas digestivas, y las células ductales, que forman conductos por donde se secretará una solución de bicarbonato facilitando la digestión. En contraste, la parte endocrina del páncreas se compone de grupos de células conocidos como islotes de Langerhans, con función de producir y liberar diversas hormonas, como el glucagón y la insulina, directamente en el torrente sanguíneo. (Kleeff et al., 2016)

## Introducción

Dentro de los diferentes subtipos de cáncer de páncreas, el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) es el más común en términos de prevalencia, donde el 85% de los tumores de páncreas son de este subtipo celular (Luo et al., 2019). Siguiendo el modelo clásico de la evolución del ADP, se postula que su origen se relacionaría con distintas lesiones precursoras, habiéndose identificado, a su vez, diversos orígenes celulares para estas lesiones. Por tanto, el ADP, se puede desarrollar a partir de cualquiera de los dos tipos celulares, tanto por las células acinares como de las ductales, aunque siendo estas últimas las más posibles de sufrir el proceso de transformación. Específicamente, se han descrito tres tipos de lesiones precursoras con origen en las células ductales basadas en características histológicas, genéticas y clínicas: las neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMNs), que se desarrollan en los ductos pancreáticos; las neoplasias quísticas mucinosas (MCN), caracterizadas por la producción de una sustancia viscosa y una fuerte reacción desmoplásica; y las neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanINs), que se originan en los conductos intralobulares. De las tres descritas, las PanINs son las más relevantes en el contexto del desarrollo del ADP, ya que son las mejor caracterizadas a nivel molecular y anatómico además de desempeñar un papel fundamental en la progresión hacia el adenocarcinoma invasivo.

Las PanINs se categorizan siguiendo un sistema que correlaciona los hallazgos histológicos con las alteraciones genéticas. En el primer estadio, PanIN-1A, las lesiones presentan características histológicas que incluyen metaplasia mucinosa, que se traduce en la presencia de células columnares con núcleos pequeños y ovalados, además de una abundante producción de moco supranuclear. Desde una perspectiva genética, aproximadamente un 40% de las lesiones PanIN-1A exhiben mutaciones en el gen *KRAS*, alterado en más del 80% de los ADP. En segundo lugar, PanIN-1B, caracterizadas por la inactivación del gen *CDKN2A* y por la aparición de una arquitectura papilar. El siguiente estadio, PanIN-2, se caracteriza por una arquitectura papilar y una atipia nuclear moderada. Además del cambio morfológico, desde el punto de vista genético se produce la inactivación del gen supresor tumoral *INK4A*. La última lesión precursora, considerada el carcinoma *in situ*, es la lesión PanIN-3, esta se caracteriza por una estructura papilar similar a las PanIN-2, pero presenta necrosis celular y una atipia nuclear severa. Desde una perspectiva genética, encontramos la inactivación de *TP53* y la pérdida de *SMAD4* y *BRCA2* (**Figura 1**). (Chan-Seng-Yue et al., 2020; Collisson et al., 2019; Peters et al., 2018)



**Figura 1. Modelo de desarrollo de ADP.** Figura representativa de las diferentes alteraciones genéticas e histológicas presentes en progresión tumoral del ADP en los estadios diferenciados de lesiones intraepiteliales pancreáticas (PanIN). Figura adaptada de Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897–909.

Este modelo descrito se encuentra en duda por parte de la comunidad científica, ya que, como describe *Notta et al.*, en aquellos tumores que presentan un proceso tumoral más agresivo con un crecimiento y capacidad metastática mayor, las diferentes mutaciones se dan de una manera simultánea, y no de una manera secuencial, debido a la gran inestabilidad genómica presente y a procesos de cromotripsis (*Notta et al.*, 2016). Estos procesos de cromotripsis son responsables de la enorme heterogeneidad tumoral característica de este tipo tumoral. Estudios de secuenciación de nueva generación han permitido la identificación de nuevas mutaciones y la clasificación del ADP en distintos subgrupos moleculares con valor pronóstico y predictivo (*Chan-Seng-Yue et al.*, 2020; *Collisson et al.*, 2019). Entre las distintas mutaciones más relevantes se puede encontrar el ejemplo de *MDB4* (*methyl-CpG binding domain 4*), proteína encargada del mantenimiento de la estabilidad genómica y la reparación al DNA, que se encuentra mutada en ADP, favoreciendo así la tumorigénesis de la enfermedad (*Cheng et al.*, 2019; *Riccio et al.*, 1999). Otro ejemplo es *KDM2B*, lisina demetilasa, que se encuentra sobre-expresada en ADP y es necesaria para el progreso tumoral en modelos murinos (*Cheng et al.*, 2019; *Wong et al.*, 2016).

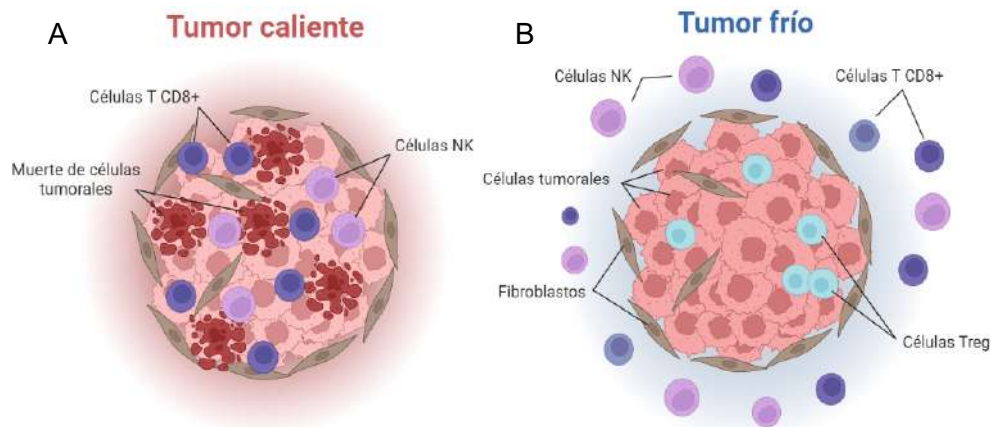
Como se ha comentado anteriormente, las principales células precursoras de la enfermedad son las ductales, sin embargo, las células acinares presentan también un papel importante en el desarrollo del ADP. Se ha demostrado como los procesos inflamatorios, como la pancreatitis, inducen la desdiferenciación de las células acinares y su posterior transdiferenciación a una célula "tipo ductal", a través de un proceso conocido como metaplasia acino ductal (ADM); este cambio es reversible pero cuando se mantiene en el tiempo, por ejemplo, debido a una pancreatitis crónica, puede conducir a una transformación celular y la formación del ADP. (Chan-Seng-Yue et al., 2020; Collisson et al., 2019; Guerra et al., 2007; Notta et al., 2016)

- **Microambiente tumoral en ADP**

Uno de los principales problemas asociados al ADP es la enorme reacción desmoplásica constituyendo un denso estroma fibroso que rodea a las células tumorales y que ocupa casi el 80% del volumen total. Este tejido fibroso y poco vascularizado dificulta el acceso de los distintos tratamientos y aumenta la quimiorresistencia asociada (Ollauri-Ibáñez et al., 2021). Dentro del microambiente tumoral existen múltiples interacciones heterotópicas entre las células tumorales y su microambiente a través de la liberación de distintos factores o citoquinas, responsables de la inmunosupresión asociada a este tumor. Desde el punto de vista inmunológico, el ADP es un "tumor frío" (Xiao et al., 2021), caracterizado por la presencia de células del sistema inmune pro-tumorales (macrófagos con fenotipo M2, linfocitos T reguladores (Treg), células estrelladas (PSCs), linfocitos T *helper* (Th17 y Th2)). Este ambiente inmunosupresor dificulta el acceso de poblaciones inmunes anti-tumorales (linfocitos T CD8+, células *natural killer* (NK), macrófagos M1). (Elinav et al., 2013; Ino et al., 2013; Ollauri-Ibáñez et al., 2021; Porcelli et al., 2019; Velasco et al., 2022).

Por otro lado, los "tumores calientes" se caracterizan por una alta infiltración de células T CD8+ y un enriquecimiento de las vías moleculares que activan el sistema inmunitario (Ollauri-Ibáñez et al., 2021). Estos tumores responden mejor a las terapias de inmunoterapia en comparación con los tumores fríos (Duan et al., 2020). Esta diferencia entre ambos tipos de tumores se debe, en parte, a las interacciones mediadas por citoquinas inflamatorias presentes en el microambiente tumoral, producidas tanto por las células tumorales como por las poblaciones inmunes. Sin embargo, el porcentaje

de tumores calientes asociados al ADP es bastante bajo, lo que resalta la complejidad de la dinámica de la respuesta inmune en el contexto de los tumores y la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas para modular eficazmente la respuesta inmunológica.



**Figura 2. Modelo tumoral según el componente celular.** (A) Microambiente tumoral relacionado con tumores calientes, caracterizado por la infiltración de células T CD8+ y células NK. (B) Microambiente tumoral asociado a tumores fríos, en el que las células de fibroblastos activados (CAFs) forman un estroma denso, con presencia de células inmunosupresoras y ausencia de infiltración de células inmunocompetentes.

Profundizando en los tipos celulares responsables del carácter inmunosupresor del microambiente tumoral y de la reacción desmoplásica asociada al ADP, se encuentran tal y como se ha expuesto anteriormente, los CAFs. Encargados del mantenimiento de la estructura del estroma a través de la producción de componentes celulares como son el colágeno tipo I, II y IV, proteoglicanos y factores de crecimiento. Estas células derivan de distintas líneas precursoras como son las células estrelladas pancreáticas (PSCs), fibroblastos residentes pancreáticos y células madre mesenquimales y serán diferenciadas a CAFs a través de la exposición de estas células a citoquinas como son IL1, IL6 o  $TNF\alpha$ , presentes en el microambiente tumoral. (Pereira et al., 2019; Porcelli et al., 2019; Stouten et al., 2023; Velasco et al., 2022)

En el microambiente tumoral, podemos encontrar la presencia de distintas subpoblaciones de células linfoides, como son el caso de las células CD4+ T, linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Entre las distintas poblaciones de estas células CD4+ linfoides destacan las células T reguladoras (Treg). La presencia y reclutamiento de estas

## Introducción

células al microambiente tumoral es mediada tanto por las propias células tumorales (Wang et al., 2017) como de macrófagos asociados a tumor (TAMs) (Rubie et al., 2010). Las células Treg presentan un papel de protección de las células tumorales, a través de la inhibición de la actividad citotóxica de células T CD8+ (Sakaguchi et al., 2010; Zhang et al., 2020).

Además de las células linfoides, también destacan las células mieloides asociadas a tumor, donde, dentro de este grupo celular se engloban los neutrófilos asociados a tumor (TANs), células mieloides supresoras (MDSCs) y los macrófagos asociados a tumor (TAMs) (Velasco et al., 2022).

Los TANs, aunque en estadios tempranos de la enfermedad presenten un papel anti-tumoral, la secreción citoquinas como TGF- $\beta$  (Qin et al., 2020), CXCL8 (Ogawa et al., 2019), CXCL1 (Nozawa et al., 2006) por parte de las células tumorales, modificaran su fenotipo a uno pro-tumoral. Esto, en última instancia, favorecerá los procesos de angiogénesis, metástasis y la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Lianyuan et al., 2020).

En cuanto a las MDSCs, consisten en una mezcla de precursores inmaduros de macrófagos y granulocitos que se dividen en dos subgrupos principales: monocíticos (M-MDSC) y polimorfonucleares (PMN-MDSC). Estas células se caracterizan por la inmunosupresión de los linfocitos T CD8+ gracias a la expresión de IL-10, estimulando a su vez la expansión y reclutamiento de células Treg (Huang et al., 2006); la inhibición de la actividad citotóxica de las células NK (C. Liu et al., 2007); y la polarización de los TAMs al fenotipo pro-tumoral (Sinha et al., 2007; Velasco et al., 2022).

La última población celular mioleide presente en el microambiente tumoral son los macrófagos. Una vez se encuentran en el microambiente tumoral, ya sea a través de extravasación de monocitos circulantes o diferenciación de células residentes en el tumor, comienzan un proceso de polarización influido por las citoquinas y quimiocinas presentes (Lavin et al., 2015; Orekhov et al., 2019). Esta polarización da lugar a dos poblaciones de macrófagos: macrófagos M1 o clásicos, que, aunque muestran un fenotipo pro-inflamatorio y antitumoral, en estadios iniciales de la enfermedad favorecerán la progresión de las células tumorales mediante la inducción de inflamación crónica en el tejido (Casanova-Acebes et al., 2020). La segunda población presente son

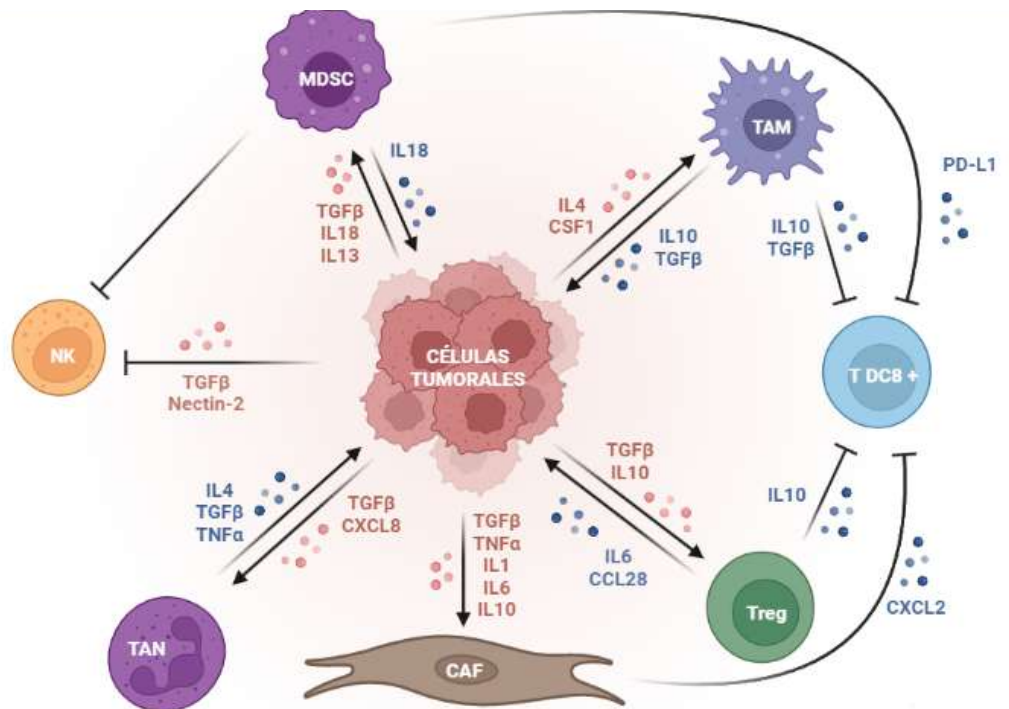
los macrófagos M2, con función pro tumoral debido la producción de citoquinas que median una respuesta antiinflamatoria e inmunosupresora. (Chen et al., 2019; Murray et al., 2014; Poh & Ernst, 2018).

A pesar de que la polarización hacia el fenotipo M1 tiende a ser predominante en las etapas tempranas del ADP, a medida que progresa el desarrollo tumoral es el fenotipo M2 el que gana importancia (Balkwill & Mantovani, 2012). Estos macrófagos a su vez producirán una serie de citoquinas y factores de crecimiento que estimularán el crecimiento de las células tumorales, entrando en un proceso de retroalimentación positiva que favorecerá la progresión tumoral (Poh & Ernst, 2018).

Es importante destacar la existencia de al menos cuatro subgrupos distintos de macrófagos de tipo M2. Tanto estos subgrupos como los macrófagos asociados al tumor (TAMs) se caracterizan por la secreción de citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-10 y TGF $\beta$ , inhibiendo la actividad citotóxica de células T CD8+ (Jarnicki et al., 2006), y de CCL22, a través del reclutamiento de células Treg a microambiente tumoral (Lin et al., 2023). Estas citoquinas promueven el mantenimiento del entorno inmunosupresor característico del ADP. Además, estos macrófagos liberarán otras citoquinas que desempeñan un papel fundamental en procesos como la invasión, metástasis, angiogénesis y progresión tumoral, incluyendo CCL20, VEGF y CSF-1 (Lin et al., 2023; B. Liu et al., 2016; Velasco et al., 2022; Yang et al., 2021).

- **Papel de la inflamación en el ambiente tumoral en ADP**

Como se ha podido ver, el complejo microambiente tumoral presente en el ADP es uno de los principales factores de la baja supervivencia asociada, donde encontramos un mayor reclutamiento de células inmunes pro-tumorales y la inactivación de la citotoxicidad de las anti-tumorales. Es por esto, por lo que es importante el conocer las intercomunicaciones presentes en el microambiente tumoral entre las distintas poblaciones tumorales e inmunes. Estas complejas redes de comunicación se dan principalmente a través de la producción y liberación tanto de citoquinas como de otros factores moduladores de la actividad celular (**Figura 3**).



**Figura 3. Intercomunicaciones presentes en el microambiente tumoral entre las células tumorales y los distintos subtipos de células del SI.**

De entre todas las citoquinas cuya presencia determina el carácter del microambiente tumoral, cabe destacar la familia de las interleuquinas 1. Este grupo de citoquinas desempeña un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata, activando la expresión de genes inflamatorios. Dentro de esta familia, destacan la interleuquina 1-alfa ( $IL1\alpha$ ) y la interleuquina 1-beta ( $IL1\beta$ ), cuya expresión se relaciona con los factores de transcripción NF $\kappa$ B y AP1 (Ji et al., 2019). A pesar de compartir la misma ruta de activación, estas citoquinas son procesadas de manera distinta, desempeñan funciones diferentes y parecen no coincidir en términos de localización celular (Baker et al., 2019).

Tanto  $IL1\alpha$  como  $IL1\beta$  existen en formas precursoras y fragmentadas, pero solamente  $IL1\alpha$  es biológicamente activa en ambas formas.  $IL1\alpha$ , en particular, se clasifica entre las citoquinas con una función dual, actuando a nivel de la membrana al unirse a su receptor y a nivel nuclear como un factor de transcripción (Baker et al., 2019; Dinarello, 2018). En cambio,  $IL1\beta$  solo es biológicamente activa en su forma fragmentada, en un proceso mediado por la caspasa 1. (Dinarello, 2018)

Se ha evidenciado una relación directa entre la expresión de IL1 $\alpha$  y la activación de la cascada del factor de transcripción NF $\kappa$ B, llevando consigo la expresión de citoquinas anti-inflamatorias que favorecen el proceso tumoral (Baker et al., 2019; Voronov et al., 2003). Estudios demuestran como la sobreexpresión de IL1 $\alpha$  en modelos *in vitro* de ADP induce un fenotipo metastásico (Melisi et al., 2009). En línea con estos descubrimientos, se ha observado que el cultivo conjunto de células de ADP y CAFs aumentaba los niveles de factores inflamatorios, donde se encontraba IL1 $\alpha$  (Tjomsland et al., 2011).

De igual manera, diversos estudios demuestran como IL1 $\beta$  está vinculada a un efecto pro-tumoral (Apte et al., 2006; Carmi et al., 2013; Dinarello, 2018; Voronov et al., 2003). En el ámbito clínico, se ha observado como los pacientes que presentan tumores productores IL1 $\beta$ , tienden a tener un pronóstico más desfavorable (Carmi et al., 2013). Otros estudios demuestran como la producción de esta citoquina activa a las células endoteliales para la producción de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y otros factores pro-angiogénicos (Carmi et al., 2013). Del mismo modo a lo que ocurría con IL1 $\alpha$ , se ha demostrado la relación directa entre la producción de IL1 $\beta$  y los procesos metastáticos (Guo et al., 2016; Weichand et al., 2017).

Junto con la familia de las interleuquinas 1, hay otros grupos de citoquinas que también se han relacionado con la progresión tumoral, como es el caso de la interleuquina 6 (IL6) (Grivennikov et al., 2009; Rašková et al., 2022). Se ha comprobado que esta interleuquina ejerce su función pro-tumoral principalmente a través de la vía de señalización STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), y en menor medida, mediante la interacción sinérgica entre esta vía y el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Grivennikov et al., 2009; Hirano, 2021; Johnson et al., 2018). Concretamente, en el contexto del cáncer de páncreas, se ha observado cómo esta interleuquina favorece la expresión de citoquinas que promueven la proliferación celular, la evasión del sistema inmune y la resistencia a apoptosis (Block et al., 2012).

Múltiples estudios demostraron la función de otros factores de transcripción encargados de la producción de las distintas citoquinas y factores de crecimiento. Entre ellos se encuentra *MYC* (Sodir et al., 2011, 2019), donde la sobreexpresión de c-MYC en

ADP aumentaba los niveles de producción de CXCL5, quimioatrayente de neutrófilos Ly-6B+ (Zhou et al., 2012) y de CCL2 y CCL9, citoquinas encargadas de la polarización de macrófagos a M2 (Fang et al., 2021; Sodikin et al., 2011, 2019).

- **Terapias en clínica asociadas a ADP**

Únicamente el 15% de los pacientes diagnosticados son capaces de presentar una remisión tumoral y en muchos casos presentándose una recaída en los años consiguientes, esto se debe, como se ha comentado anteriormente, a la gran quimiorresistencia que presenta el tumor, donde muchos de los tratamientos basados en monoterapia (5-FU, gemcitabina, paclitaxel) son solo funcionales para una fracción de pacientes respondedores (Conroy et al., 2018).

A este pronóstico desfavorable se une el fracaso de la inmunoterapia en el tratamiento de este tumor, en parte debido a su baja inmunogenicidad mediada principalmente por la reacción desmoplásica. Por lo tanto, la interrupción de esta red inmunosupresora y la inducción de la citotoxicidad asociada a las células T CD8+ representan las oportunidades más prometedoras que actualmente se están investigando para el tratamiento del ADP (Timmer et al., 2021).

Actualmente se encuentra en estudio el uso de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), como vacuna en ADP murino; los resultados demostraron como estas células eran capaces de prevenir en un 75% la formación tumoral. En tumores establecidos, el uso de estas células aumentaba el reclutamiento de células T CD8+ en conjunto con una disminución de células Treg (Ouyang et al., 2021).

Otros estudios se han centraron en la utilización de antagonistas para CD40, proteína presentada por parte de las células Treg a las T CD8+, inhibiendo su actividad citotóxica, en conjunto con gemcitabina (O'Hara et al., 2021).

También se ha dirigido los estudios a la activación de las células T CD8+, mediante la inhibición de la unión de PD-1 a PD-L1, molécula presente en las células tumorales que promueve la auto tolerancia al inhibir la activación y proliferación de células T. La vía de unión de PD-1 a PD-L1 puede bloquearse mediante inhibidores de

punto de control inmunitario anti-PD-1 o anti-PD-L1. Ensayos clínicos están demostrando como la utilización de estos inhibidores en conjunto con quimioterapia, mejoran la eficacia del tratamiento (O'Reilly et al., 2019; Weiss et al., 2018).

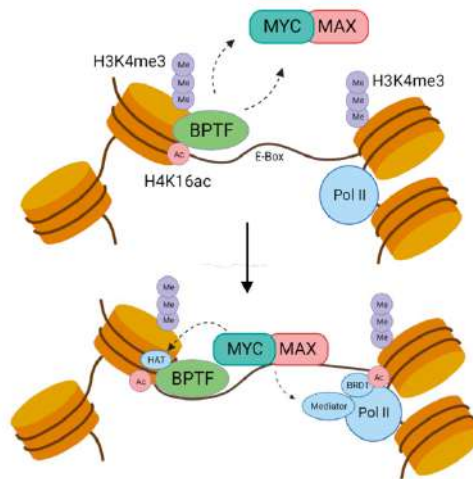
Como se ha podido ver, diversos estudios y ensayos clínicos demuestran como la búsqueda de dianas terapéuticas relacionadas con la reprogramación del EMT, abriendo nuevos horizontes para el tratamiento de esta enfermedad. Es por tanto necesario el estudio del complejo enfoque tanto genético como del EMT, para la mejora de la supervivencia asociada al ADP.

- **Uso de remodeladores de cromatina como diana terapéutica en ADP**

Estos resultados abren un nuevo horizonte en la identificación de posibles nuevas dianas terapéuticas y estudios demuestran como los reguladores epigenéticos pueden ser objetivos prometedores para el desarrollo de inhibidores específicos (Hasan & Ahuja, 2019). Como ejemplo, se encuentra el uso del inhibidor de BRD4, remodelador de la cromatina de la familia BET (bromodominio y extra terminal), denominado JQ1. Estudios recientes han demostrado el potencial terapéutico de este inhibidor en ADP, disminuyendo la progresión tumoral y aumentando la sensibilidad de las células a inhibidores de PARP. También se ha podido comprobar un efecto sinérgico al administrarse concomitante junto a gemcitabina, potenciando así el daño en el ADN (García et al., 2016; Miller et al., 2019, 2021). Además de JQ1, un nuevo inhibidor de BET, I-BET762, demostró eficacia en la inhibición de la proliferación en células de ADP y aumentaba la sensibilidad a la gemcitabina tanto *in vitro* como *in vivo* (Xie et al., 2018). Estos resultados demuestran el posible potencial de los remodeladores de la cromatina como dianas terapéuticas para el tratamiento del ADP.

- **BPTF**

Entre los distintos remodeladores de la cromatina, BPTF (Bromodomain PHD Finger Transcription Factor) destaca como miembro del complejo NURF (factor de remodelación de nucleosomas dependiente de ATP). Este remodelador de cromatina es capaz de reconocer las marcas epigenéticas H3K4me3 y H4K16ac, promoviendo el deslizamiento de nucleosomas y la eyección de H1, favoreciendo así, el posterior acceso y lectura de distintos factores de transcripción (Jones et al., 2000). El reconocimiento de esas marcas por BPTF, así como la remodelación subsiguiente, son necesarias para el reclutamiento de factores de transcripción a sus genes diana y el inicio de su actividad transcripcional, como es el caso de c-MYC (**Figura 4**) (Richart, Real, et al., 2016).



**Figura 4. Modelo de interacción del tándem BPTF-MYC.** Reclutamiento del complejo MYC-MAX, tras el reconocimiento de las marcas epigenéticas y remodelación de la cromatina por BPTF. Figura adaptada de Richard et al., 2016.

Para promover su unión al ADN y provocar la transcripción de sus genes diana, c-MYC forma heterodímeros con MAX, reconociendo secuencias específicas denominadas E-box. En el genoma existen más de 25.000 sitios de unión de c-MYC, y el reconocimiento de estos lugares está condicionado por el contexto epigenético. La presencia de distintas marcas de histonas, como H3K4me3, H3K79me y H3ac, definen los sitios de unión de alta afinidad, mientras que los sitios de baja afinidad exhiben marcas represoras como H4K16ac. Estos últimos, ya que c-MYC se encuentra sobre expresado en un 42% de los tumores de ADP, regulan la expresión de genes asociados al proceso tumoral, tales como genes de proliferación, metástasis y resistencia a

quimioterápicos. Para la unión a la cromatina, c-MYC requiere remodeladores de cromatina específicos, donde se encuentra de BPTF, capaz de reconocer las mismas marcas epigenéticas que c-MYC. En apoyo a esta hipótesis, estudios anteriores del laboratorio demostraron cómo el silenciamiento de *BPTF* alteraba la actividad transcripcional de c-MYC, dificultando su unión a los sitios de baja afinidad y por tanto reduciendo el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratón de ADP independiente de KRAS dirigido por c-MYC (Ela1-MYC). Demostrando a su vez como no impactaba el tejido pancreático normal (Richart, Real, et al., 2016). Por tanto, el estudio del papel de BPTF en un modelo dependiente de KRAS supondría una mayor fidelidad a las modificaciones genéticas presentes en el ADP y sería extrapolable a clínica.



## **Objetivos**

---



El adenocarcinoma ductal pancreático es una enfermedad devastadora con un pronóstico inferior al 11%, por lo que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas es una urgencia clínica. Trabajo anterior del laboratorio demostró el potencial terapéutico de BPTF en un modelo de ratón de ADP dirigido por c-MYC (Ela1-c-MYC), reduciendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral. En este trabajo se pretende validar el potencial terapéutico de BPTF en un modelo dependiente de *KRAS*. Por una parte, analizando su impacto en procesos de proliferación y migración tanto *in vitro*, en líneas celulares de ADP, como *in vivo*, utilizando modelos preclínicos de ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes en combinación con gemcitabina. Por otra parte, se pretende estudiar el papel de BPTF en la remodelación del microambiente tumoral a través de la alteración en la expresión de distintas citoquinas, este cambio en su expresión favorecería el cambio del ADP de un "tumor frío" a un "tumor caliente".

Por tanto, el presente trabajo se divide en un objetivo principal y una serie de subobjetivos

- **Estudiar el papel de BPTF en el proceso tumoral**

- Papel de BPTF en proliferación y migración: se realizarán estudios tras el silenciamiento de *BPTF* en una serie de líneas de ADP para comprobar el papel de BPTF en proliferación y migración.
- Papel de BPTF en sensibilidad a gemcitabina: como se ha comentado anteriormente uno de los principales problemas asociados a esta enfermedad es su quimiorresistencia, por tanto, se estudiará como el silenciamiento de *BPTF* afecta a la sensibilidad a la gemcitabina en un panel de líneas de ADP.
- Papel de BPTF como remodelador del microambiente tumoral: el ambiente inmunosupresor del ADP dificulta el acceso de las poblaciones antitumorales a las células malignas, por tanto, centraremos el estudio en estudiar como el silenciamiento de *BPTF* modula la expresión de citoquinas en el microambiente tumoral.



## **Materiales y métodos**

---



- **Líneas celulares utilizadas**

Se utilizaron líneas celulares humanas T3M4, Patu 8988 T, Panc1 y Patu 8988 S, todas ellas derivadas de carcinoma de páncreas y con mutaciones iniciadoras en KRAS, así como la línea celular HEK-293T, para la generación de vectores lentivirales. Estas líneas celulares fueron cultivadas siguiendo protocolos estandarizados. Se empleó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enriquecido con glucosa y L-glutamina para el cultivo de las líneas celulares T3M4, Patu 8988 T, Panc1 y Patu 8988 S. Para la línea celular murina de carcinoma de páncreas (KPC-CHX), se utilizó medio RPMI suplementado con glucosa y L-glutamina. Los monocitos humanos inmortalizados (THP-1) fueron cultivados en medio RPMI, suplementado con glucosa y L-glutamina, al que se le añadió PMA a una concentración de 10 ng/ml para la polarización a macrófagos M0.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado y antibióticos (Penicilina-estreptomicina). Se llevó a cabo un seguimiento periódico para verificar la ausencia de contaminación por micoplasma utilizando el kit de detección de micoplasma Venor GeM OneStep.

- **Aislamiento de monocitos primarios**

Se obtuvieron monocitos de ratones C57BL/6 a partir del fémur, los cuales fueron cultivados en medio RPMI enriquecido con factor estimulante de colonias de macrófagos murinos (M-CSF recombinante murino) durante un período de cinco días, hasta que se observó la diferenciación de los monocitos a macrófagos M0. Posteriormente, se pusieron en contacto con las diferentes condiciones a estudiar y se llevaron a cabo los experimentos correspondientes.

Además, se obtuvieron monocitos primarios aislados de donaciones de sangre de pacientes humanos. Para ello, se realizó una centrifugación con el uso de PanColl para separar las tres capas: plasma, buffy coat y eritrocitos. La capa de buffy coat fue recolectada y lavada con PBS. Posteriormente, se resuspendió en medio de cultivo IMDM para macrófagos enriquecido con un 10% de suero humano y se sembraron en placas de cultivo. Tras 24 horas, se reemplazó el medio y se incubaron durante una semana hasta que se pudo observar, a través de su morfología, que habían diferenciado en

macrófagos M0. Una vez obtenidos los macrófagos M0, se llevaron a cabo los experimentos correspondientes. Cabe destacar que el experimento de citometría fue realizado por Juan Carlos López Gil en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

- **Sistemas de inhibición (shARN y CRISPRi)**

Para el silenciamiento de la expresión de BPTF, se emplearon dos short hairpin RNAs (shRNA) tanto para humano como para murino, dirigidos contra dos regiones diferentes del ARN mensajero (ARNm) de BPTF, designados como shBPTF#1 y shBPTF#2 para humano (VJ86 y VJ87 respectivamente), y shBPTF#1 y shBPTF#2 para murino (VJ621 y VJ622 respectivamente). Se incluyó un shRNA de control (shSCR) con una secuencia irrelevante (VJ287). Estos shRNA fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Francisco X Real (CNIO). Además, se diseñaron varios ARN guías (gRNA) tanto para humano como para murino, dirigidos a diferentes regiones del gen BPTF, específicamente a +50 y +200 desde el punto de inicio de la transcripción (TSS), utilizando herramientas como CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018) y Benchling (Biology WebSoftware; 2022; <https://benchling.com>) (ver Tabla suplementaria 1).

Posteriormente, las parejas de gRNA fueron alineadas y clonadas en el vector CRISPR/KRAB (pKLV-U6gRNA (BbsI)-PKG-puro2A-BFP) (Addgene #76659), utilizando los sitios de restricción BbsI y siguiendo el protocolo descrito por Thakore et al. (Thakore et al., 2015). Se llevó a cabo la ligación del plásmido e inserto, transformación en células hospederas, formación de colonias y finalmente secuenciación para confirmar la integridad de las construcciones.

Para la construcción del sistema BPTF KO (knockout), se diseñaron guías específicas contra el exón 12 de BPTF y se insertaron en una secuencia conocida para facilitar su posterior clonaje en el plásmido con la Cas9: gBlocks (ver Tabla suplementaria 1). Posteriormente, el gBlock se ligó al plásmido lentiCRISPR v2 (addgene #52961) (VJ422). Se llevó a cabo la transformación en células hospederas, formación de colonias y finalmente secuenciación para confirmar la integridad de las construcciones.

- **Producción de vectores virales**

La producción de los vectores virales se realizó utilizando la línea celular Hek293T. Para la transfección, se empleó cloruro cálcico, y los virus resultantes fueron recolectados en dos intervalos temporales, a las 48 y 72 horas posteriores al proceso de transfección. Se generaron los vectores lentivirales utilizando los plásmidos pCMV-VSV-G (VJ288), psPAX2 (VJ289) y cada uno de los constructos de silenciamiento. Como control de la transfección, se incluyó el plásmido FG12 (VJ272), que contiene una secuencia codificante para la proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Una vez obtenidos, los virus fueron sometidos a un proceso de filtración y congelados para su uso en experimentos posteriores.

El proceso de infección se llevó a cabo en las líneas celulares tumorales bajo estudio. Durante la infección, se añadió polibreno (Polibreno; Sigma-Aldrich, cat: H9268-5G) a una concentración de 1X, basada en una concentración en stock de 1000X (5 mg/ml). Para la selección de las células que habían incorporado el constructo correspondiente, se utilizó puromicina (Puromicina; Sigma-Aldrich, cat: P8833-10MG) a una concentración de 2 a 3 mg/ml, dependiendo de la línea celular utilizada.

- **Ensayos celulares de proliferación y colonias**

Para determinar la viabilidad celular, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en las cuales se sembraron  $2 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 1, 2, 3, 4 y 7 días, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 0,5%, lavadas dos veces con PBS 1x y luego incubadas con cristal violeta al 0,5% en metanol al 25%. Posteriormente, el cristal violeta fue eluido con ácido acético al 10% y se determinó la absorbancia a 590 nm. Para evaluar la formación de colonias, se sembraron  $5 \times 10^2$  células en placas de 6 pocillos y, después de 14 días, las células fueron procesadas como se describió anteriormente. Los resultados fueron representados utilizando Graphpad (<https://www.graphpad.com>).

- **Ensayos de migración celular**

Para los ensayos Transwell (Transwell; Corning, cat: 10107341), se sembraron  $2 \times 10^5$  células de las diferentes líneas celulares en cada cámara superior en DMEM o RPMI con 0,1% de suero fetal bovino (FBS) y se colocaron en un pocillo con las diversas

## Materiales y métodos

condiciones a estudiar: DMEM con 10% de FBS, medio condicionado de células silenciadas para BPTF o en contacto con otras líneas celulares. Al día siguiente, las cámaras se fijaron con glutaraldehído al 2,5%, se lavaron dos veces con PBS1X (PBS; Corning, cat: 21-020-CM) y se incubaron con violeta cristal al 0,5% en metanol al 25%. Cada cámara se fotografió con microscopio óptico y se analizó con ImageJ (<https://imagej.net/ij/ij/index.html>).

Para los ensayos de heridas, las células se cultivaron hasta alcanzar la confluencia en DMEM con 10% de FBS y luego se sustituyó el medio por DMEM con 0,1% de FBS. Se realizó una herida utilizando una punta rascando la placa longitudinalmente mientras se monitoreaba la cicatrización de la herida durante 4, 6 y 24 horas. La cicatrización de la herida se cuantificó utilizando el software ImageJ.

- **Ensayo de perfil de ciclo celular**

El perfil del ciclo celular se determinó utilizando el reactivo FxCycle™ Violet Ready Flow™ (FxCycle™ Violet Ready Flow™; ThermoFisher Scientific, cat: R37166) mediante citometría de flujo, donde se añadieron dos gotas del reactivo a las muestras, seguido de incubación y análisis. Los resultados obtenidos fueron analizados con FlowJo v10 (<https://www.flowjo.com>) y posteriormente representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Ensayo de IC50 a gemcitabina**

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células en placas de 96 pocillos y se determinó la IC50 de Gemcitabina (Gemcitabina; ACCORD, cat: 691980.4 OH) mediante una curva fármaco/respuesta utilizando diferentes diluciones de Gemcitabina. Después de 72 horas de tratamiento, se determinó la viabilidad celular utilizando el kit ATP-Lite (ATP-Lite; PerkinElmer, cat: 6016731) y se utilizó un lector luminométrico (EnSpire® Multimode Plate Reader; PerkinElmer) para la medición. Los resultados obtenidos se representaron utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Ensayo celular de Calceína-AM**

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células en placas opacas de 96 pocillos. Tras 24 horas, se determinó la captación de Calceína-AM (Calceína-AM; Invitrogen, cat: C1430) según las instrucciones del fabricante en las dos condiciones a estudio: con Calceína-AM o después del tratamiento con Calceína-AM y Verapamilo (Verapamilo; Abcam, cat: ab120140) a una concentración de 3 mmol/L. La fluorescencia se determinó a 494/520 nm utilizando un lector luminométrico (EnSpire® Multimode Plate Reader). Se realizó una comparación entre ambas condiciones por cada línea celular con o sin silenciamiento para BPTF y los resultados se representaron utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Experimentos de crecimiento tumoral en animales.**

Se cultivaron las líneas celulares T3M4 y Patu 8988 T silenciadas con BPTF (gBPTF #6 y gBPTF #8) y con una secuencia irrelevante (gSCR). Las células tumorales ( $2 \times 10^6$ , 100 ml en PBS 40% matrigel) se implantaron por vía subcutánea en ratones *nude* hembra de 6 a 8 semanas (Rj: ATHYM- Foxn1nu/nu, Janvier Laboratories). Se administró gemcitabina a una dosis de 30 mg/kg cada 2 días por vía intraperitoneal cuando el volumen tumoral llegó a 200 mm<sup>3</sup>; el volumen tumoral se evaluó cada 4 días. Los volúmenes se calcularon mediante la fórmula  $L \times W^2 \times 0,5$ . Los resultados se representaron en Graphpad (<https://www.graphpad.com>). La línea celular de KPC-CHX silenciada para BPTF y su control con una secuencia irrelevante fueron implantadas por vía subcutánea en ratones C57/BL6. El crecimiento se monitorizó como se ha descrito previamente. Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

Todos los experimentos in vivo se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las directrices institucionales para el tratamiento y cuidado de animales de experimentación. El alojamiento de los ratones y la realización de los diferentes experimentos se llevaron a cabo conforme a las normativas aprobadas por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre (CEI 20/377) y La Comunidad de Madrid (PROEX 312.8/21). Además, se garantizó la adhesión a las directrices éticas establecidas en los Principios Guía Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales, desarrollados por el Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).

- **PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)**

El ARN total se aisló a partir de células cultivadas utilizando NucleoSpin RNA (NucleoSpin RNA; Macherey-Nagel, cat: 22740955.250) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se generó el ADNc a partir de 1 µg de ARN utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa (TaqMan Reverse Transcription Reagents; Thermo Fisher, cat: N8080234). La amplificación y el análisis de la qPCR se llevaron a cabo utilizando el sistema 7500HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) y la mezcla maestra GoTaq(R) qPCR Master Mix (GoTaq; Promega, cat: A6001). Los niveles de ADNc se normalizaron con respecto a la expresión de HPRT o GAPDH mediante el método DDcT. Las secuencias de los oligos se pueden encontrar en la Tabla suplementaria S1. Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Chip-qPCR**

Las células fueron fijadas con formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y la fijación se detuvo mediante la adición de glicina (0,125 M). Después de la recolección por raspado, las células fueron precipitadas y lisadas en tampón LB1 suplementado con inhibidores de proteasa (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). Tras la centrifugación, los núcleos se resuspendieron en 1 mL de tampón LB2 y se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente, tras una nueva centrifugación, se añadió tampón SDS ChIP y se sometieron a los núcleos a sonicación, obteniéndose fragmentos de ADN de aproximadamente 300-500 pb. Se cuantificó la proteína y se incubaron 1,5 mg de proteína con 10 µL de anti-MYC (anti-MYC Cell Signaling c-Myc CST (1679402S)) o IgG (Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control #3900) durante la noche. Luego, las microesferas se bloquearon y se añadieron a las muestras. Tras una incubación, las microesferas se lavaron con tampón de dilución Triton, tampón de lavado de micelas mixtas, tampón 500 y tampón LiCl. El ADN se eluyó en tampón de elución y se separó de las proteínas únicas mediante incubación durante la noche a 65 °C. El ARN y las proteínas se digirieron con RNasa A y Proteinasa K, y el ADN se purificó mediante extracción con el kit de purificación de Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit, #28104). La cantidad de ADN en los eluidos de ChIP se analizó mediante qPCR con pares de oligos diseñados para obtener productos de 50-200 pb. Las secuencias de los oligos figuran en

la Tabla Suplementaria 1. Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Inmunofluorescencia (IF)**

El ensayo de inmunofluorescencia se realizó en células fijadas con formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron bloqueadas con BSA al 5% (Corning, cat: 11583560) y Tritón X-100 al 0,3% (Sigma-Aldrich, cat: 9036-19-5) durante 60 minutos. Los cubreobjetos fueron tratados con anti- $\gamma$ H2AX (1:400; fosfo-histona H2A.X; Cell Signaling, cat: 9718) en BSA al 1% y Tritón X-100 al 0,3% durante la noche. Luego, se incubaron con Alexa Fluor 594 (Life Technologies, cat: A11012) y DAPI (Panreac AppliChem, cat: E-08211). Finalmente, los cubreobjetos se montaron con el reactivo ProLong Gold (ThermoFisher Scientific, cat: P36934) y se analizaron en el microscopio de fluorescencia THUNDER Imager (Leica).

- **Tratamiento con TNF $\alpha$**

Las líneas celulares T3M4 y KPC-CHX, previamente infectadas con shRNAs dirigidos contra BPTF tanto humano como murino (shBPTF#1, shBPTF#2 y shSCR), fueron tratadas con Factor de Necrosis Tumoral alfa recombinante humano (TNF $\alpha$ ) (TNF $\alpha$  humano recombinante; R&D Systems, cat: 210-TA) a una concentración de 20 ng/ $\mu$ l, 24 horas después de su siembra. Tras un período adicional de 24 horas, se procedió a la recolección tanto de los sobrenadantes como de las células para experimentos posteriores.

- **Estudio del perfil proteico secretorio (Array de citoquinas)**

Los arrays de citoquinas se llevaron a cabo siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial, tanto a nivel humano (Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit; R&D Systems, cat: ARY022B) como murino (Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit; R&D Systems, cat: ARY028). Los datos resultantes se filtraron inicialmente con aquellos que mostraban un cambio de expresión respecto al control con una secuencia irrelevante (SCR) de al menos un 25%. Una vez obtenidos los posibles candidatos, se analizó la media entre los distintos valores y su desviación estándar. Los datos se representaron en un heatmap utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Análisis de los niveles de secreción de IL1 $\alpha$**

Tras un período de 24 horas después del tratamiento con TNF $\alpha$ , los medios de cultivo fueron recolectados y sometidos a una centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Se recogieron los sobrenadantes resultantes y se congelaron a una temperatura de -80°C hasta su uso. Posteriormente, se evaluaron los niveles de IL-1 $\alpha$  presentes en cada muestra utilizando el kit IL-1 alpha Human ELISA Kit (IL-1 alpha Human ELISA Kit; Thermo Fisher Scientific, cat: BMS243-2) siguiendo el protocolo estandarizado por el fabricante. Para visualizar los resultados del ensayo de ELISA, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm utilizando un luminómetro (EnSpire®). Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Análisis de poblaciones de macrófagos tras tratamiento**

Para el análisis de poblaciones de macrófagos mediante citometría de flujo, se procedió de la siguiente manera: las células fueron tripsinizadas y bloqueadas utilizando Flebogamma (Grifols) a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se pusieron en contacto las células con cada uno de los distintos anticuerpos de estudio y se dejaron en una incubación de 30 minutos en hielo. En todos los ensayos, se añadieron 2  $\mu$ g/ml de DAPI con el fin de facilitar la identificación y exclusión de células no viables. Las células se resuspendieron en buffer de citometría (Flow buffer) y se procedió a la caracterización. Para el análisis de la citometría, se utilizó el citómetro Attune NxT con 4 láseres de Thermo Fisher Scientific. La posterior interpretación y análisis de los datos se realizó utilizando la herramienta FlowJo. Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>).

- **Western Blot (WB)**

Las proteínas de interés fueron extraídas utilizando un tampón de lisado que contenía detergente NP-40 al 10% (NP-40; Milipore, cat: 492016-100ML) en combinación con inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free; Roche, cat: 11873580001). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una digestión mecánica mediante sonicación y se procedió a cuantificar la concentración de proteína utilizando el kit "DC Protein Assay" (DC Protein Assay; Bio-Rad, cat: 5000116). Las muestras se

mezclaron con un buffer de carga (4X Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, cat: 161-0747) y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C. Posteriormente, se cargaron en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) y la membrana se bloqueó utilizando leche al 5%. Se procedió a incubar la membrana con anticuerpos primarios específicos (Arginasa 1, Cell Signaling, cat: 93668; BPTF, Millipore, cat: ABE24; NFκB, Cell Signaling, cat: 8242; Anti-Flag, Sigma, cat: F1804) durante la noche. Al día siguiente, se lavó la membrana y se incubó con anticuerpos secundarios específicos. La detección de las proteínas se realizó siguiendo las indicaciones del kit comercial "Clarity Western ECL Substrate" (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad, cat: 170-5061) utilizando la máquina ImageQuant Las4000 (Typhoon).

- **Co-inmunoprecipitación**

Para llevar a cabo la co-inmunoprecipitación de BPTF y NFκB, se siguieron los siguientes pasos: Transfección celular: Las células 293T fueron transfectadas con los plásmidos Flag-BPTF (VJ79) y Flag-Control (VJ34). Posteriormente, se incubaron durante 72 horas después de la transfección. Estimulación con TNFα: Las células transfectadas fueron tratadas con TNFα a una concentración de 20 ng/μl durante 8 horas para inducir la respuesta celular. Lisado celular: Tras el tratamiento con TNFα, las células fueron lisadas y los lisados fueron recolectados. Cuantificación de proteínas: Los lisados celulares fueron lavados y cuantificados para utilizar 1 mg de proteína por muestra. Inmunoprecipitación: Las muestras de lisado se pusieron en contacto con beads conjugadas con un anticuerpo anti-Flag (Red anti-Flag; Millipore, cat: F2426) y se incubaron durante la noche para permitir la unión específica de las proteínas de interés a los anticuerpos. Lavado y elución: Al día siguiente, se lavaron las muestras para eliminar las proteínas no unidas y se procedió a eluir las proteínas unidas a los anticuerpos. Western blot: Se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos contra NFκB y BPTF para detectar la presencia de estas proteínas en las muestras. Este procedimiento permitió analizar la interacción entre BPTF y NFκB mediante co-inmunoprecipitación y posterior detección mediante Western blot.

- **Inmunohistoquímica (IHC)**

Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, se utilizaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor de muestras fijadas en paraformaldehído e incluidas en parafina. La tinción de Ki67 se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-Ki67 humano (Ki-67 (D2H10) Rabbit mAb; Cell Signaling, cat: 9027) en un equipo Leica Bond-III (Leica Biosystem). Los núcleos se tiñeron a su vez con hematoxilina para permitir su visualización y contraste. Posteriormente, las muestras fueron analizadas para cuantificar la cantidad de núcleos positivos para Ki67 utilizando software de análisis de imágenes como ImageJ. Este proceso permitió determinar la proliferación celular en las muestras analizadas. Los resultados obtenidos fueron representados utilizando GraphPad (<https://www.graphpad.com>), proporcionando una visualización clara y concisa de los datos de proliferación celular. La inmunohistoquímica con Ki67 es una técnica comúnmente utilizada para evaluar la proliferación celular en muestras histológicas, lo que proporciona información importante sobre la actividad celular en diferentes tipos de tejidos y condiciones patológicas.

- **Análisis bioinformático de transportadores ABC**

Los valores de expresión de ABCC1, ABCC2, ABCC3 y ABCC4 en E $\mu$ -Myc se obtuvieron de la serie GSE141647 de Gene Expression Omnibus. Asimismo, los valores de expresión y unión a MYC para ABCC1, ABCC2, ABCC3 y ABCC4 en WT y E $\mu$ -Myc se descargaron del estudio de Sabò et al. (2014). El cambio en la expresión o la unión se calculó en relación con el control. Para visualizar estos datos, se generaron heatmaps utilizando la librería de Python seaborn. Este análisis proporciona información sobre la expresión y la unión a MYC de los transportadores ABC en condiciones normales y en el contexto del modelo E $\mu$ -Myc, lo que puede ayudar a comprender mejor su función en la regulación génica y la oncogénesis.

- **Reducción dimensional y clústering**

En el proceso de RNA-seq y clustering, se implementó una reducción dimensional de los datos de expresión genética a través de un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el paquete de Python scikit-learn (versión 1.3.2) (Pedregosa et al., 2012). Previamente, se escaló los datos para que tuvieran una media de 0 y una

desviación estándar de 1 mediante el método StandardScaler, también incluido en el mismo paquete. Para el clustering de las muestras del TCGA, realizado por el profesor Luis Bote, se tomaron las dos primeras componentes del PCA previamente calculado. Se aplicó el método de modelos gaussianos mixtos y un enfoque de aprendizaje automático no supervisado con dos componentes, utilizando el método GaussianMixture.

- **Análisis WGCNA**

Para el análisis de WGCNA, se empleó el conjunto de datos de expresión de RNA del TCGA en Python, utilizando el paquete PyWGCNA (versión 1.20.4) (Reese et al., 2023). El análisis constó de varias fases:

1. Preprocesamiento: Se identificaron outliers mediante el método preprocess de la clase WGCNA.
2. Búsqueda de Módulos de Genes Coexpresados: Se utilizó el método findModules, que generó un grafo de coexpresión libre de escala y lo subdividió en módulos de genes.
3. Análisis de Correlación de Módulos: Se llevó a cabo un análisis de correlación entre los módulos de genes y variables asociadas a las muestras utilizando el método analyseWGCNA. Las variables estudiadas incluyeron edad, género, estatus nodal (N), tamaño del tumor (T), metástasis (M), grado histológico del tumor (G1-2 para más diferenciados, G3 para menos diferenciados), y la variable de pertenencia al clúster 1 o 0 calculada previamente.

- **Deconvolución de células inmunes**

Para llevar a cabo la deconvolución de la infiltración de células del sistema inmune en los pacientes del TCGA, se emplearon dos métodos del paquete de Python TumorDecon (Aronow et al., 2022) (versión 1.1.1): SingScore (Foroutan et al., 2018) y DeconRNASeq (Abbas et al., 2009).

1. SingScore: Este método se basa en la puntuación de muestras únicas al clasificar
2. su expresión génica para firmas moleculares. Se generaron matrices con puntuaciones SingScore para cada tipo de célula inmune por muestra.
3. DeconRNASeq: Este método se basa en modelos lineales y requiere de una matriz de expresión de referencia para los tipos celulares que se quieran cuantificar (la

matriz por defecto es de poblaciones de células inmunes). Se obtuvieron matrices con frecuencias DeconRNASeq para cada tipo de célula inmune por muestra.

Posteriormente, se compararon los niveles medios de cada tipo celular entre los dos clústeres previamente calculados mediante un t-test (o Wilcoxon en caso de no normalidad) utilizando la librería Scipy (versión 1.11.2) (Virtanen et al., 2020). Los resultados significativos ( $p < 0.05$ ) se representaron mediante boxplots y heatmaps (clustermaps) utilizando Seaborn. Los heatmaps incluyeron la pertenencia al clúster y los datos se organizaron según un clústering jerárquico.

- **RNA-seq**

Se silenció la expresión de BPTF en células T3M4 mediante un shRNA (shBPTF#1). Una vez silenciadas las células se trataron con  $TNF\alpha$  y se extrajo el ARN mediante el kit RNeasy Mini Kit (50) (kit RNeasy Mini Kit (50); QIAGEN, cat: 74104). Una vez obtenido el ARN se enviaron las muestras por cuadruplicado a Beijing Genomics Institute's (BGI), donde se generaron librerías mediante el método de cDNA y se llevó a cabo la secuenciación utilizando la tecnología "DNA nanoball sequencing" (DNB-seq). Este proceso produjo lecturas pareadas almacenadas en archivos FASTQ, que sirvieron como punto de partida para el análisis posterior.

El análisis bioinformático de estos archivos incluyó varias etapas: primero, se realizó un control de calidad utilizando FASTQC (versión 0.12.0, <https://github.com/s-andrews/FastQC>); luego, se llevó a cabo un proceso de "trimming" mediante la herramienta Trim Galore, para eliminar los adaptadores de la secuenciación. Posteriormente, se efectuó un alineamiento con el genoma de referencia GRch38 utilizando STAR (versión 2.7.11a) (Dobin & Gingeras, 2015) y finalmente, se procesaron los archivos BAM resultantes para generar una matriz de cuentas mediante featureCounts (Liao et al., 2014), un algoritmo implementado en el paquete Subread (versión 2.0.6). Como paso final de control de calidad, se empleó la herramienta multiQC (versión 1.19) (Ewels et al., 2016) para generar un informe resumen de todas las etapas mencionadas anteriormente, asegurando así que los resultados de este procesamiento sean de alta calidad y permitan continuar con el análisis. Para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial con datos de bulk-RNA-Seq, se empleó la herramienta pyDeseq2 (versión 0.4.4) en Python. Este proceso requiere como entrada una tabla (matriz de expresión) que contiene las cuentas brutas en formato genes x muestra, otra tabla de

metadatos que especifica a qué condición pertenece cada muestra, y la indicación de las condiciones a comparar, así como cuál es la condición de referencia. Como resultado, se genera una matriz de expresión normalizada y una tabla con los resultados del análisis, detallando el "Log2 Fold Change" o el "P-valor ajustado" (corregido para el descubrimiento de falsos positivos o FDR mediante el método de Benjamini-Hochberg), entre otros parámetros.

Se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento de sets de genes (GSEA), que permiten evaluar el enriquecimiento de firmas moleculares mediante la clasificación de genes en función de su correlación con la condición de interés. Utilizando las matrices de expresión normalizadas, se obtuvo como resultado un valor de puntuación de enriquecimiento normalizado (NES). Este valor es positivo cuando hay una correlación positiva con la condición de referencia y negativo cuando correlaciona con la condición opuesta. Además, se proporciona un valor de significancia (test de permutación) corregido por FDR, considerándose significativo si  $p < 0,25$ .

En situaciones con más de dos condiciones a comparar, se aplicó el análisis de variación de sets de genes (GSVA). Este análisis, también incluido en GSEApY, calcula un valor de enriquecimiento normalizado para cada muestra y firma molecular probada.

- **Análisis Estadístico**

En las figuras que presentan datos estadísticos, se garantizó la inclusión de al menos tres réplicas en cada experimento. Este enfoque permitió una evaluación exhaustiva de la variabilidad presente en las muestras analizadas. Para determinar la significancia estadística de nuestros hallazgos, empleamos principalmente análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) y pruebas de Mann-Whitney. Dichos métodos son reconocidos por su robustez y capacidad para detectar diferencias significativas en conjuntos de datos diversos y complejos. Consideramos como estadísticamente significativos aquellos resultados que exhibieron un valor de  $p$  menor a 0.05, lo cual refleja un nivel de confianza adecuado en nuestras conclusiones y contribuye a la fiabilidad y solidez de nuestros hallazgos científicos.



## **Resultados**

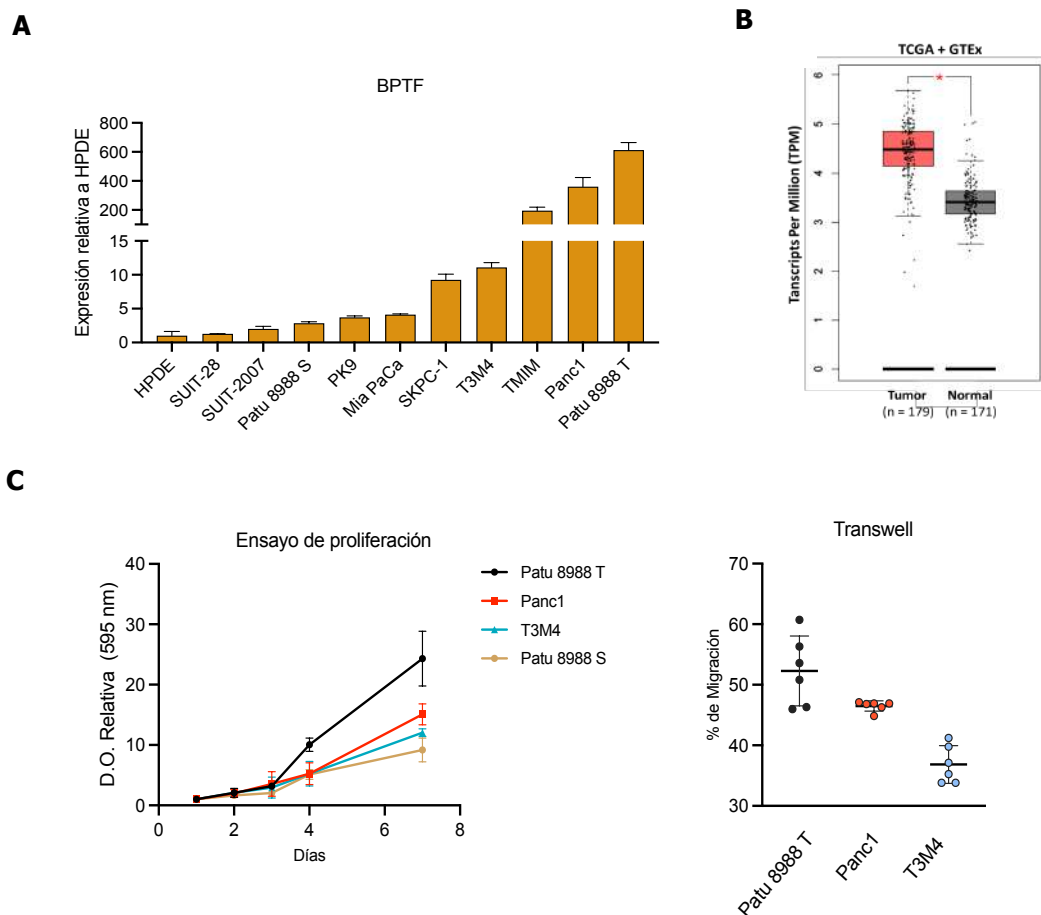
---



- **BPTF se encuentra sobre expresado en ADP**

Los niveles de BPTF en las diferentes líneas de estudio fueron validados en comparación con la línea de páncreas inmortalizada no transformada HPDE (**Figura 5A**), lo que evidenció una correlación entre la sobreexpresión de BPTF y los perfiles observados en la cohorte de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) del TCGA (**Figura 5B**). Con base en estos resultados, se optó por continuar los experimentos restantes con cuatro líneas celulares que representaban diferentes niveles de expresión de BPTF. Estas incluyeron líneas con niveles bajos de BPTF (Patu 8988 S), niveles intermedios de BPTF (T3M4), y dos líneas con niveles altos de BPTF (Panc1 y Patu 8988 T).

Se procedió a analizar la proliferación y migración de estas cuatro líneas celulares, revelando una relación directa con los niveles de BPTF. Específicamente, se observó que Patu 8988 S, con menores niveles de BPTF, exhibía una menor capacidad de proliferación y migración en ensayos de Transwell (**Figura 5C**). Estos resultados no solo respaldan la asociación entre la expresión de BPTF y la progresión tumoral, sino que también subrayan la relevancia funcional de esta proteína en los procesos biológicos implicados en el cáncer de páncreas.



**Figura 5. BPTF se encuentra sobre expresado en ADP.** (A) Niveles de expresión de *BPTF* en un panel de líneas celulares de ADP por qPCR (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , HPDE vs líneas celulares). (B) Niveles de expresión de *BPTF* en pacientes con ADP del TCGA + GTEX. (C) Ensayo de proliferación celular y Transwell de las 4 líneas celulares a estudio (Patu 8988 T, Panc1, T3M4 y Patu 8988 S) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ).

- **BPTF es necesario para la proliferación en ADP**

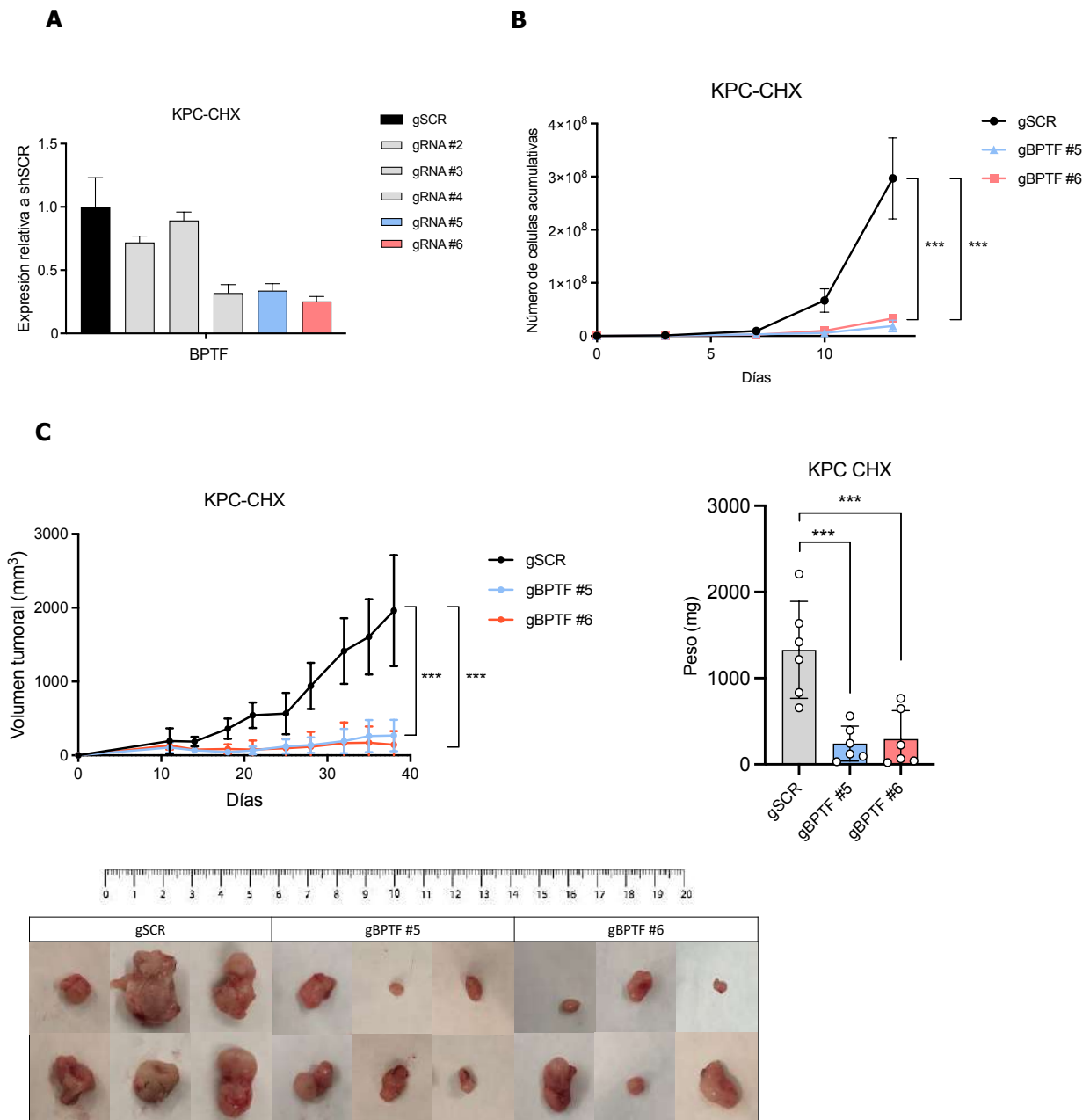
Con el fin de estudiar el papel de BPTF en proliferación, se decidió silenciar su expresión a nivel genético a través de CRISPRi o shRNA en líneas celulares de ADP murinas y humanas.

- *Inhibición de BPTF por CRISPRi en modelo singénico de ratón (KPC-CHX)*

Para evaluar el potencial terapéutico de la inhibición de BPTF durante la progresión tumoral en el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) murino, se empleó un modelo celular de ratón singénico de ADP (LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+; Pdx1-Cre, conocido como KPC-CHX), que imita la patología humana.

Se procedió a silenciar la expresión de *BPTF* mediante la técnica CRISPRi con el fin de evaluar la proliferación celular *in vitro*. Se exploraron cinco guías de ARN (gRNAs) diferentes dirigidas a la región +20/+100 del sitio de inicio de la transcripción (TSS), y se seleccionaron las dos que mostraron un mayor grado de silenciamiento para futuros experimentos (**Figura 6A**). Para evaluar el papel de BPTF en proliferación celular, se generaron curvas de crecimiento y se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias después del silenciamiento de BPTF, lo que reveló una marcada reducción en la proliferación celular (**Figura 6B**).

Para examinar la función de BPTF durante la progresión tumoral *in vivo*, se implantaron células de la línea KPC-CHX subcutáneamente en ratones C57/BL6 tras el silenciamiento de BPTF (gBPTF#5 y gBPTF#6) o utilizando una secuencia de ARN control irrelevante (gSCR) (**Figura 6C**). Los resultados indicaron que el silenciamiento de BPTF mediante CRISPRi en el modelo singénico de ratón ADP conlleva una desaceleración tanto de la proliferación celular *in vitro* como *in vivo*.

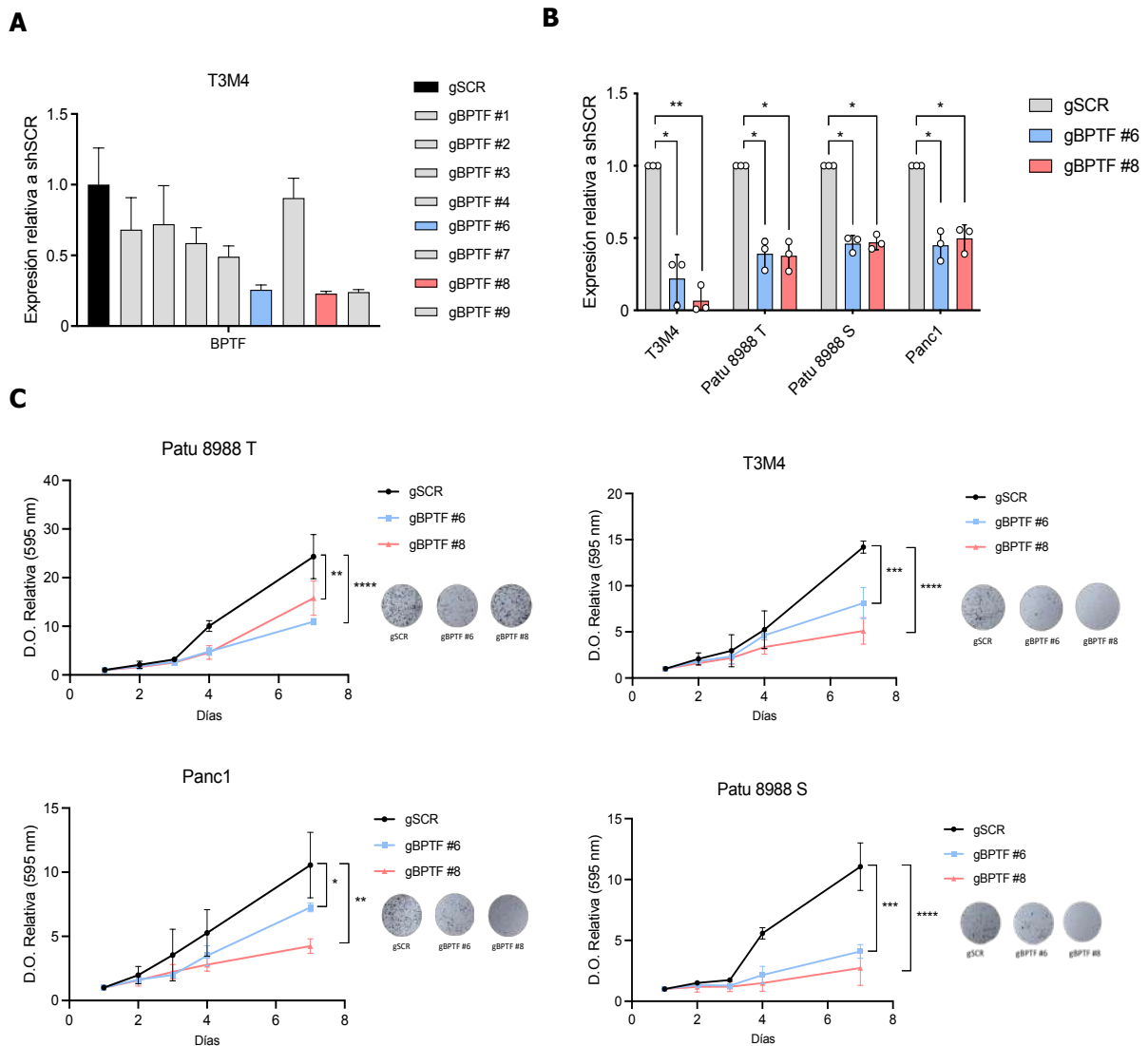


**Figura 6. El silenciamiento de *BPTF* por CRISPRi disminuye la capacidad proliferativa celular en el modelo de ADP murino. (A)** Niveles de expresión de BPTF en la línea murina KPC-CHX, tras el silenciamiento con 5 secuencias guías diseñadas en distintos lugares de la zona promotora en comparación con la secuencia control (gSCR). **(B)** Ensayo de proliferación celular en la línea KPC-CHX tras el silenciamiento de BPTF (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#5 y gBPTF#6). **(C)** Ensayo *in vivo* en ratones C57B6 tras la inyección subcutánea de células interferidas para BPTF (gBPTF#5 y gBPTF#6) frente a aquellas con la secuencia control (gSCR), estudio de los pesos de los tumores resultantes y fotografías de ellos (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$  ratones por condición gSCR vs gBPTF#5 y gBPTF#6). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

## Resultados

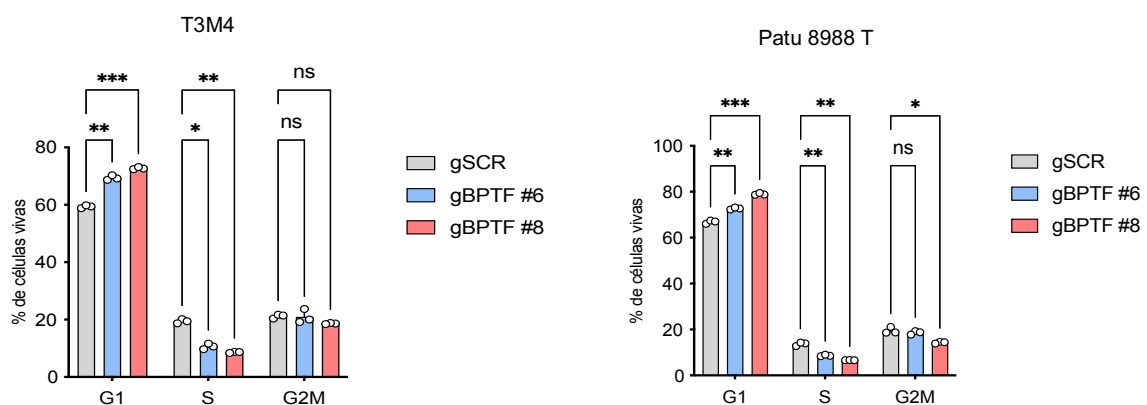
### ○ Inhibición de BPTF por CRISPRi en ADP humano

Para demostrar que BPTF es necesario para la proliferación celular en tumores de ADP humano y corroborar los resultados obtenidos en murino, se inhibió la expresión de *BPTF* mediante CRISPRi en el panel de células de ADP humanas a estudio. Se diseñaron secuencias guía específicas y seleccionaron dos de ellas que presentaban una mayor represión de BPTF (gBPTF#6 y gBPTF#8) (**Figura 7A**). Posteriormente, se redujeron los niveles de *BPTF* en las cuatro líneas celulares de ADP humanas antes mencionadas, (Patu 8988T, Patu 8988S, Panc1 y T3M4) (**Figura 7B**) y analizó la proliferación celular y la capacidad de formación de colonias (**Figura 7C**). Los resultados demostraron, como ocurría en murino, como BPTF es necesario para la proliferación celular tras el silenciamiento con CRISPRi en un panel de líneas celulares de ADP humanas.



**Figura 7. El silenciamiento de *BPTF* por CRISPRi disminuye la capacidad proliferativa en el modelo de ADP humano *in vitro*.** (A) Niveles de expresión de *BPTF* en la línea humana T3M4, tras el silenciamiento con 9 secuencias guías diseñadas en distintos lugares de la zona promotora en comparación con la secuencia control (gSCR). (B) Niveles de expresión de *BPTF* tras el silenciamiento con dos secuencias guía (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) en las cuatro líneas de estudio de ADP (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). (C) Ensayo de proliferación y colonias en las cuatro líneas de estudio tras el silenciamiento de *BPTF* con dos secuencias guía (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

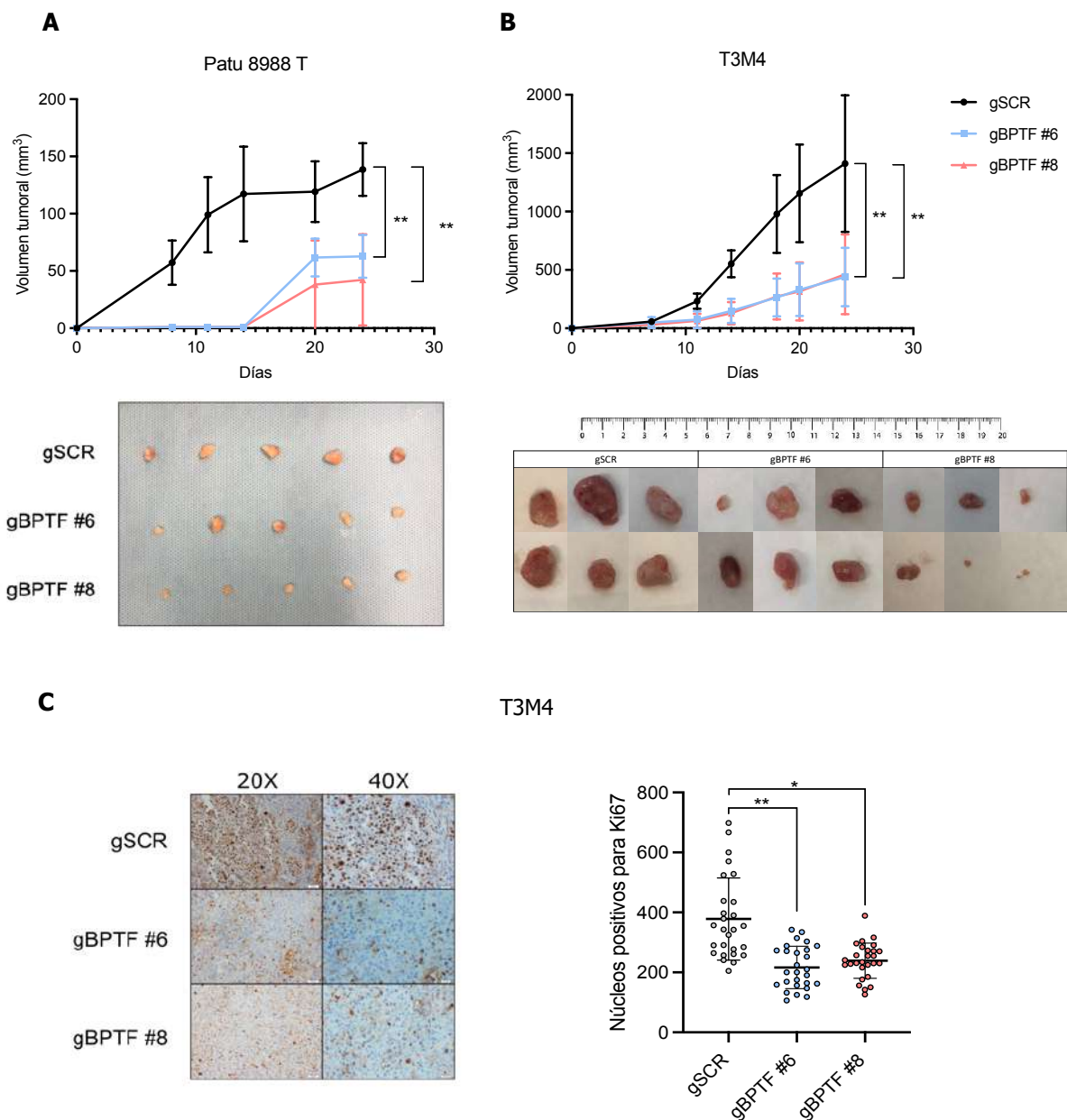
Se decidió comprobar si el descenso en la capacidad proliferativa celular era debido a cambios en el perfil de ciclo; para ello se silenció la expresión de *BPTF* y se realizó un ensayo de ciclo celular por citometría de flujo (**Figura 8**). Se pudo observar que la reducción de la proliferación celular era consistente con la acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular, junto con una disminución notable en la fase S. Este fenotipo sugiere una desaceleración en el ciclo celular, donde las células permanecen en la fase G1 durante períodos prolongados, lo que resulta en una reducción global en la progresión del ciclo celular y, por ende, en la proliferación celular. Este hallazgo respalda el papel crucial de *BPTF* en la regulación del ciclo celular y sugiere su participación en la promoción de la proliferación celular en el contexto del ADP.



**Figura 8. El silenciamiento de *BPTF* produce una parada del ciclo celular en ADP.** Estudio del perfil de ciclo celular por citometría tras el silenciamiento de *BPTF* con las dos secuencias guía a estudio (gBPTF#6 y gBPTF#8), en comparación con la secuencia control (gSCR) en las líneas celulares de ADP T3M4 y Patu 8988 T (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

## Resultados

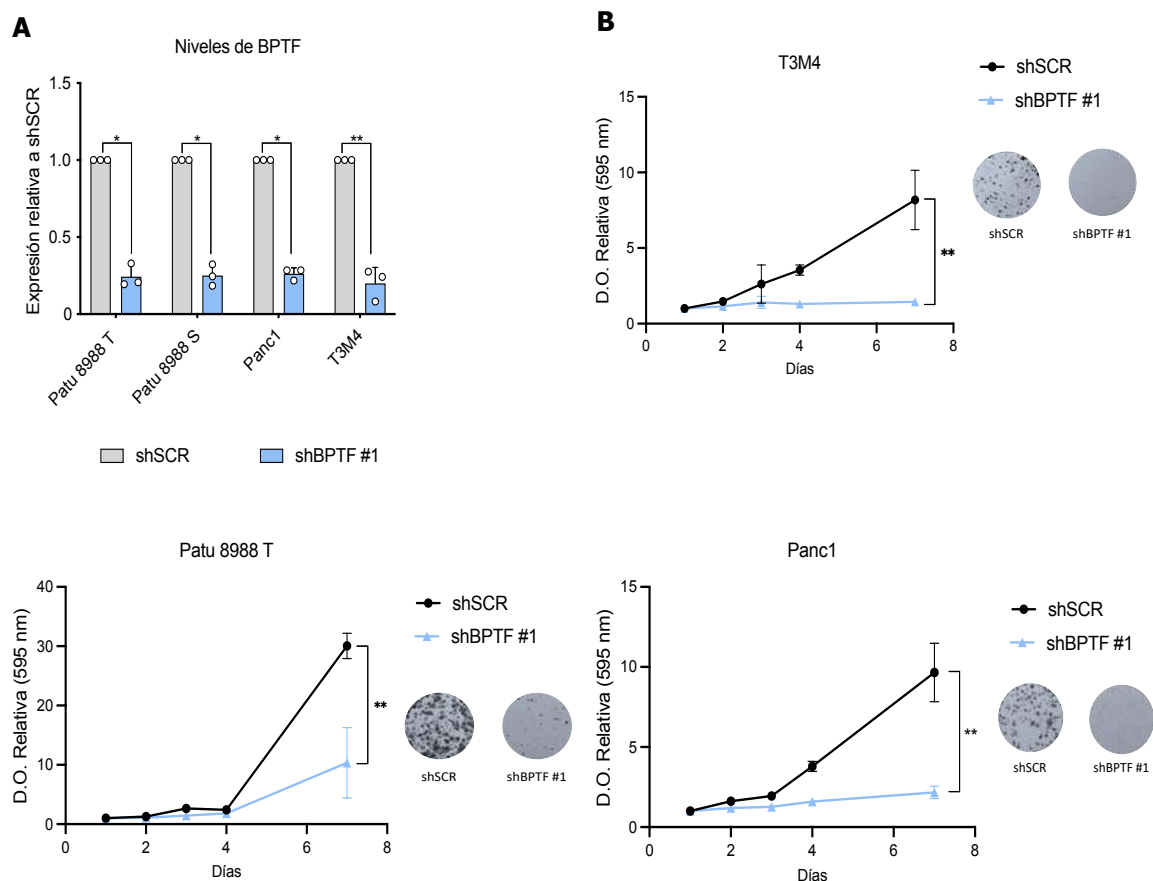
Para confirmar estos resultados *in vivo*, se implantó subcutáneamente en ratones *nude* las líneas celulares de ADP humanas T3M4 y Patu 8988 T con silenciamiento de *BPTF* (gBPTF#6 y gBPTF#8) o con secuencia irrelevante (gSCR) (**Figura 9A**). En línea con los resultados obtenidos utilizando células murinas derivadas del modelo KPC, se evidenció una notable reducción en el crecimiento tumoral después del silenciamiento de *BPTF* en ambas líneas celulares. Estos hallazgos se respaldaron adicionalmente mediante la tinción del marcador proliferativo Ki67, mostrando una reducción significativa en la señalización asociada a la proliferación celular tras el silenciamiento de *BPTF*. Estos resultados refuerzan la importancia de *BPTF* en el mantenimiento de la proliferación tumoral y sugieren su potencial como objetivo terapéutico en el contexto del adenocarcinoma ductal de páncreas. (**Figura 9B**)



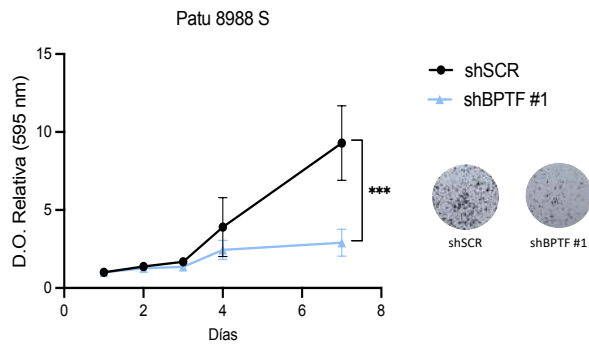
**Figura 9. El silenciamiento de *BPTF* por CRISPRi disminuye la capacidad proliferativa en el modelo de ADP humano *in vivo*.** (A) y (B) Ensayo *in vivo* en ratones *nude* tras la inyección subcutánea de células interferidas para *BPTF* (gBPTF#6 y gBPTF#8) frente a aquellas con la secuencia control (gSCR) de las líneas de ADP Patu 8988 T (Media  $\pm$  SEM,  $n = 5$  ratones por condición gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8) y T3M4 (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$  ratones por condición gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8), además de fotografías de los tumores resultantes a punto final (C). Resultados de la tinción con Ki67 de los tumores de los ratones *nude* con células T3M4 interferidas (gBPTF#6 y gBPTF#8) frente a aquellas con la secuencia control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$  tumores por condición gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

○ *Inhibición de BPTF por shRNA*

Para confirmar los resultados obtenidos mediante CRISPRi, se inhibió la expresión de *BPTF* mediante shRNA. Una vez silenciada la expresión en las cuatro líneas de estudio (Patu 8988 T, Patu 8988 S, Panc1 y T3M4) (**Figura 10A**), se realizó un ensayo de proliferación celular y de formación de colonias para comprobar si el silenciamiento de *BPTF* mediante shRNA llevaba consigo una reducción de la proliferación *in vitro*. (**Figura 10B**).



## Resultados



**Figura 10. El silenciamiento de BPTF por shRNA disminuye la capacidad proliferativa celular en el modelo de ADP humano de manera *in vitro*.** (A) Niveles de expresión de *BPTF* tras el silenciamiento con el shRNA#1 en comparación con la secuencia control (gSCR) en las cuatro líneas de estudio de ADP (Media  $\pm$  SEM,  $n=3$  por condición shSCR vs shBPTF#1) (B) Ensayo de proliferación y colonias en las cuatro líneas de estudio tras el silenciamiento de BPTF con el shRNA #1 en comparación con la secuencia control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n=3$  por condición shSCR vs shBPTF#1). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

En base en los resultados obtenidos, que están en línea con las observaciones anteriores, donde el silenciamiento de BPTF mediante CRISPRi condujo a una disminución tanto en la capacidad proliferativa como en la formación de colonias tanto *in vivo* como *in vitro*, podemos concluir que BPTF desempeña un papel indispensable en la proliferación celular y el crecimiento tumoral en el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP).

La consistencia de los hallazgos, tanto en modelos celulares humanos como murinos, respalda firmemente la idea de que la inhibición de BPTF representa una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del ADP. Estos resultados proporcionan una base sólida para la exploración adicional de BPTF como un posible objetivo terapéutico en procesos de migración celular y quimiorresistencia asociada al ADP.

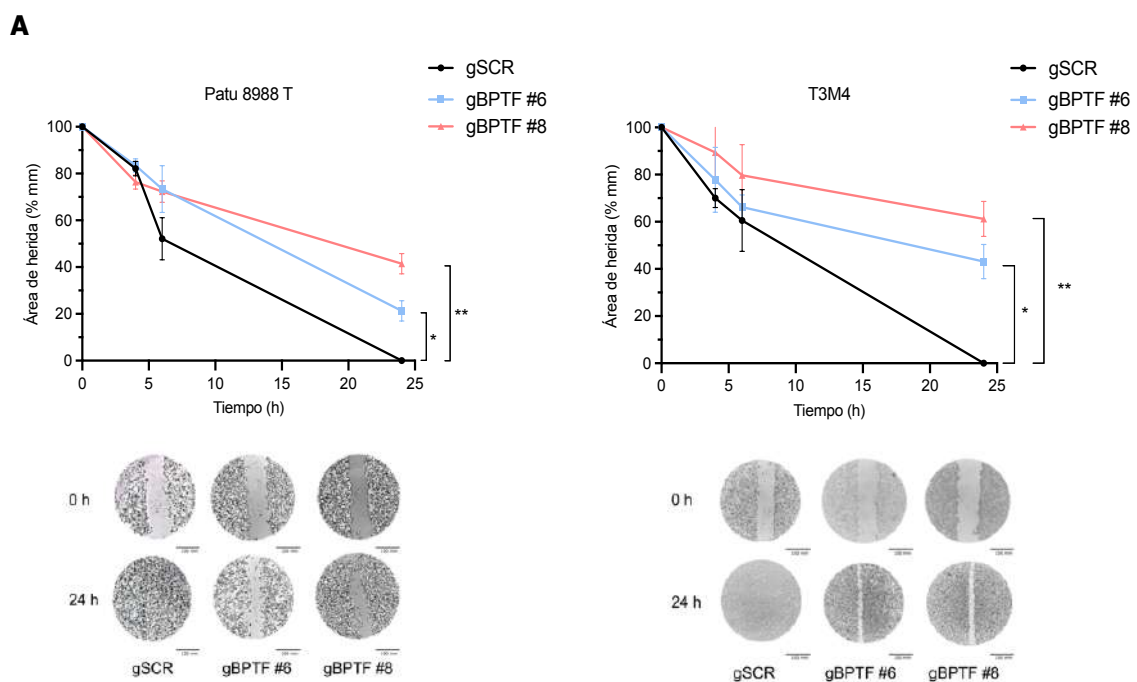
- **BPTF es necesario para la migración en ADP**

Para investigar el papel de BPTF en la migración celular, se llevó a cabo el silenciamiento de BPTF mediante CRISPRi o shRNA, seguido de la realización de ensayos de cicatrización de heridas y ensayos Transwell.

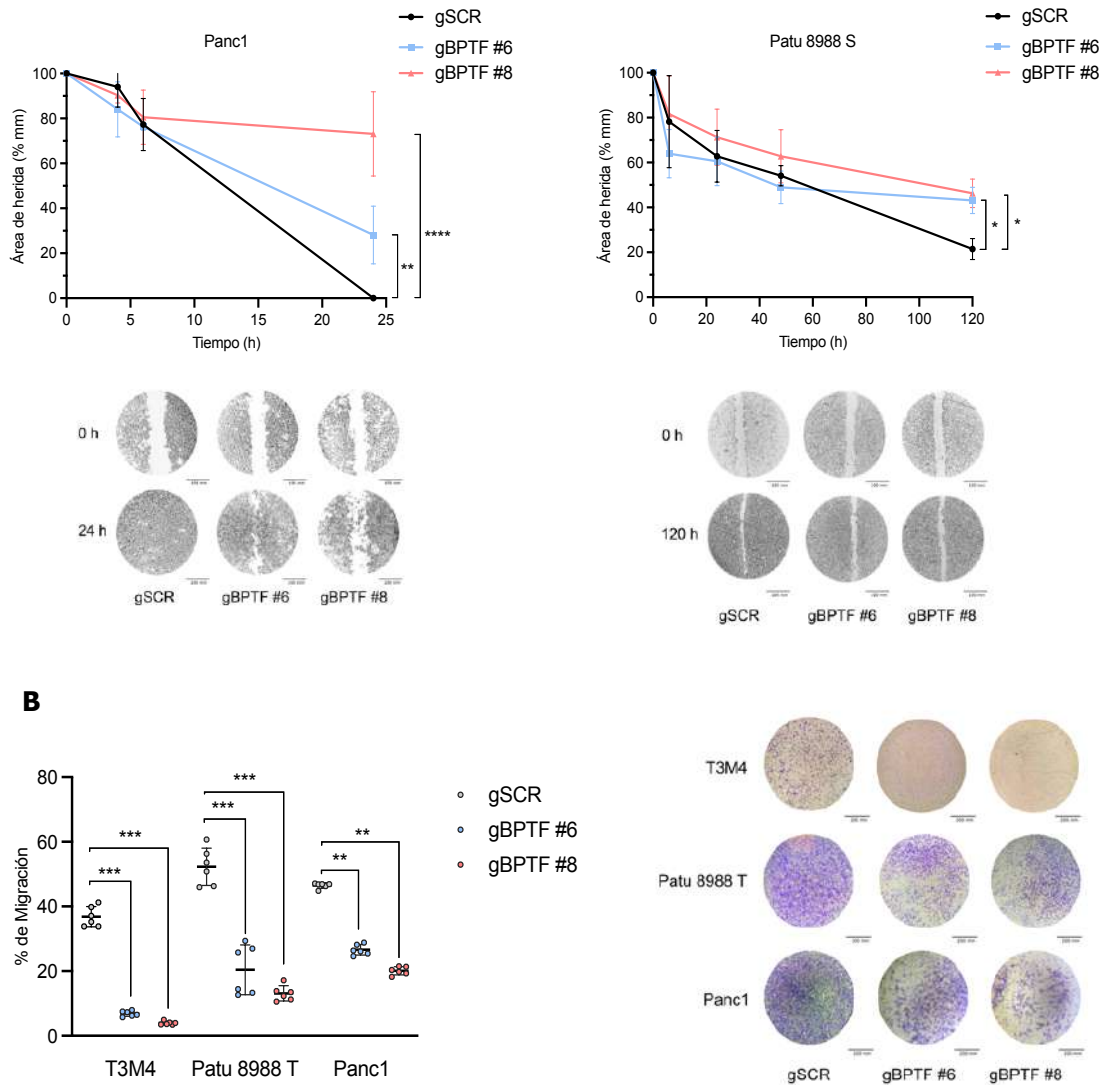
Se observó claramente que el silenciamiento de BPTF en las líneas celulares Patu 8988 T, Panc1 y T3M4 afectaba significativamente la migración celular, evidenciándose una disminución en la capacidad de cierre de la herida (**Figura 11A y Figura Suplementaria S1A**), así como una reducción en la migración a través del Transwell en los ensayos correspondientes (**Figura 11B y Figura Suplementaria S1B**).

En el caso particular de Patu 8988S, que exhibía los niveles más bajos de BPTF, se observó una incapacidad para migrar en los ensayos Transwell, además de un mayor tiempo requerido para cerrar la herida (**Figura 5A y Figura 11**).

Estos resultados destacan la importancia de BPTF en la regulación de la migración celular y sugieren su papel crítico en los procesos metastásicos asociados con el adenocarcinoma ductal de páncreas.



## Resultados

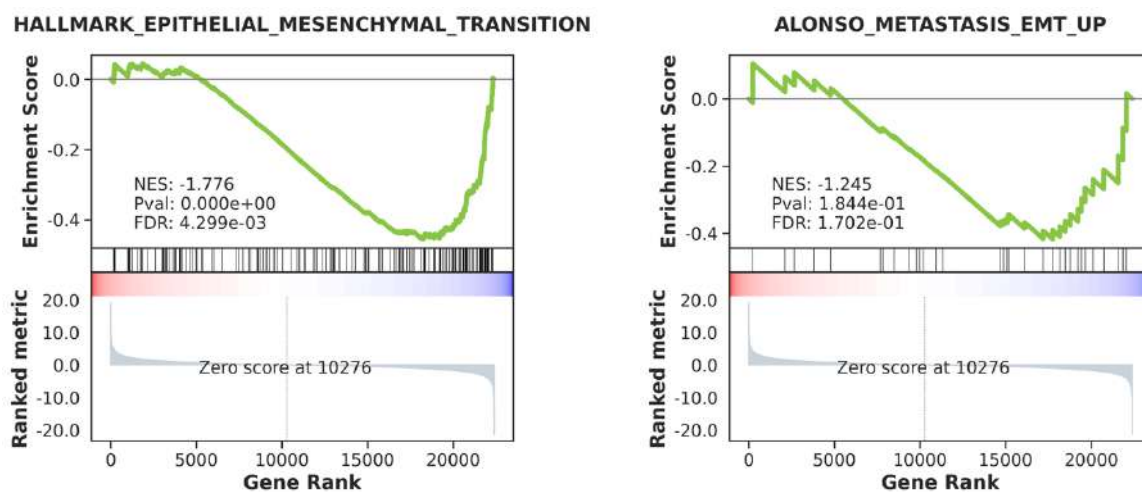


**Figura 11. BPTF es necesario para la migración celular en el modelo de ADP humano. (A)** Ensayo de cicatrización de herida tras el silenciamiento de *BPTF* con los dos guides a estudio (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) en las cuatro líneas de estudio (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). **(B)** Ensayo de transwell de 3 de las 4 líneas a estudio, tras el silenciamiento de *BPTF* con los dos guides a estudio (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

Para respaldar los datos obtenidos y fortalecer la evidencia del papel de BPTF en la metástasis y la migración, se llevó a cabo un análisis de expresión génica utilizando RNA-seq tras el silenciamiento de BPTF mediante shRNA (shBPTF#1) en comparación con una secuencia control (shSCR).

Con el fin de evaluar las implicaciones funcionales de esta inhibición, se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos Genéticos (GSEA). Los resultados del análisis de GSEA revelaron un menor enriquecimiento de genes asociados a metástasis en las muestras en las que se inhibió BPTF en comparación con el control (**Figura 12**).

Estos hallazgos proporcionan una base sólida que respalda la idea de que BPTF desempeña un papel crucial en la regulación de genes asociados con la metástasis, lo que refuerza aún más su importancia en los procesos de migración y diseminación tumoral en el contexto del ADP.



**Figura 12. El silenciamiento de BPTF disminuye la expresión de genes asociados a metástasis.** GSEA de dos signatures de metástasis y migración en la situación sin BPTF (shBPTF#1) frente al control (shSCR), donde podemos observar un NES negativo indicativo de una regulación a la baja de los genes de estas rutas ( $n=3$ , shSCR vs shBPTF#1).

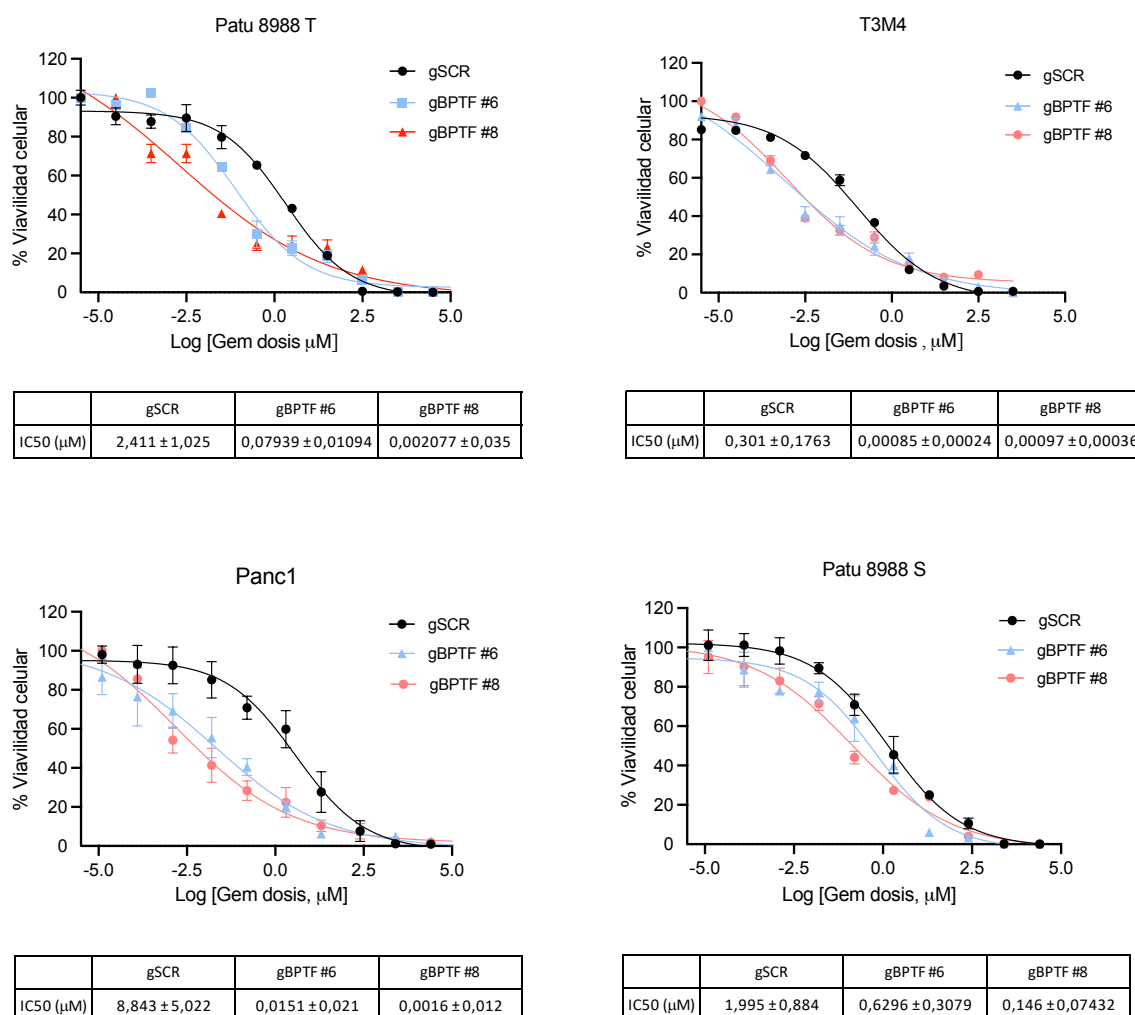
- **El silenciamiento de *BPTF* sensibiliza a las células a gemcitabina**

Para analizar la potencial sinergia entre el silenciamiento de BPTF y el tratamiento con gemcitabina, se determinó la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de este fármaco luego de la inhibición de BPTF en cada una de las distintas líneas de estudio de adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) (Patu 8988T, Patu 8988S, Panc1 y T3M4).

## Resultados

En todas estas líneas celulares, se observó una reducción significativa en los valores de IC50 después del silenciamiento de BPTF mediante CRISPRi o shRNA. Esta disminución drástica en los valores de IC50 sugiere una posible sinergia entre BPTF y la gemcitabina, donde la inhibición de BPTF potencia la efectividad de la gemcitabina en la inhibición del crecimiento celular y la viabilidad tumoral (**Figura 13 y Figura Suplementaria S2**).

Estos hallazgos sugieren que la combinación de la inhibición de BPTF con el tratamiento convencional de gemcitabina podría representar una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, y por tanto es necesario comprender los mecanismos subyacentes a esta interacción sinérgica.

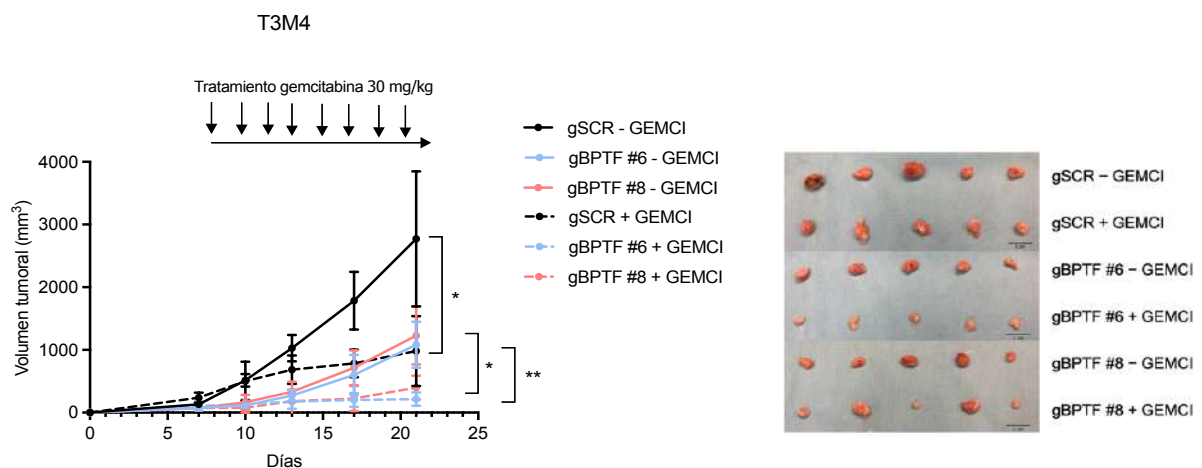


**Figura 13.** El silenciamiento de *BPTF* sensibiliza al ADP a gemcitabina *in vitro*. Ensayo de IC50 a distintas concentraciones de gemcitabina tras el silenciamiento de *BPTF* con los dos guides a estudio

(gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) en las cuatro líneas de estudio, (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

Para validar el efecto observado de manera *in vivo*, se procedió a implantar subcutáneamente células T3M4 silenciadas para BPTF (gBPTF#6 y gBPTF#8) y células control (gSCR) en ratones *nude*. Se llevó a cabo un monitoreo periódico del tamaño tumoral hasta alcanzar el estándar establecido para la administración del quimioterápico ( $200 \text{ mm}^3$ ). Una vez que se alcanzó el tamaño deseado, se administró una dosis fija de gemcitabina intraperitonealmente a  $30 \text{ mg/kg}$ , y se continuó monitoreando el crecimiento tumoral.

Se observó una reducción significativa en el tamaño tumoral tras el silenciamiento de BPTF, y esta reducción se intensificó notablemente después de la combinación con gemcitabina (**Figura 14**). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el silenciamiento de BPTF aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la gemcitabina, lo que sugiere una posible sinergia entre la inhibición de BPTF y el tratamiento con gemcitabina como estrategia terapéutica contra el ADP.



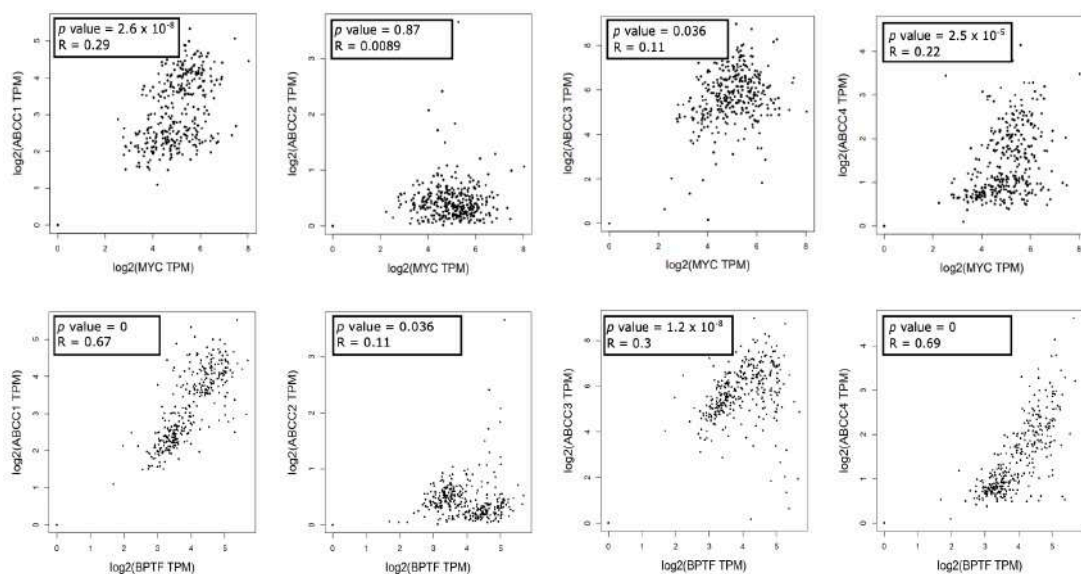
**Figura 14. El silenciamiento de BPTF sensibiliza al ADP a la gemcitabina *in vivo*.** Ensayo *in vivo* en ratones *nude* tras la inyección subcutánea de células interferidas para BPTF (gBPTF#6 y gBPTF#8) frente a aquellas con la secuencia control (gSCR) en la línea celular de ADP T3M4, una vez el tamaño tumoral alcanzó los  $200 \text{ mm}^3$  se realizaron inyecciones periódicas de gemcitabina o PBS a una concentración de  $30 \text{ mg/kg}$  y se fue controlando el tamaño tumoral (Media  $\pm$  SEM,  $n = 5$  ratones por condición, gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Fotografías de los tumores resultantes a punto final. Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

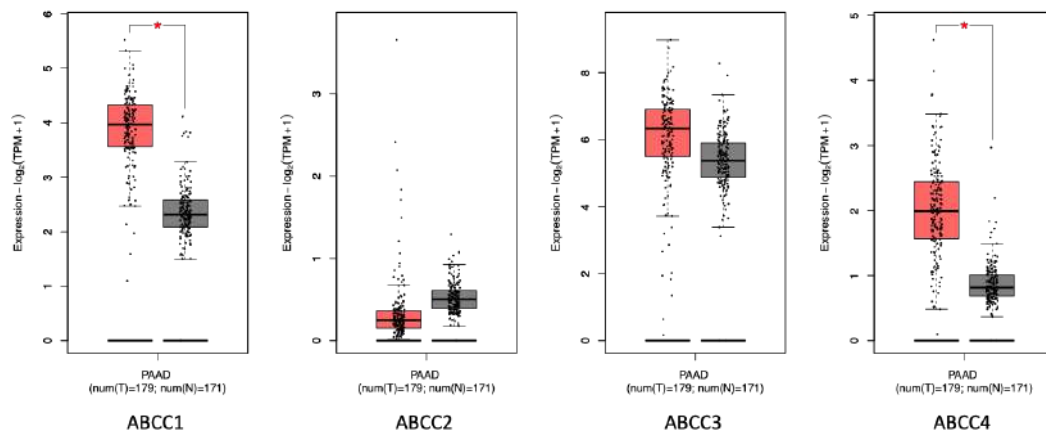
- **BPTF es necesario para la expresión de los transportadores ABC**

Los resultados obtenidos respaldaban una sinergia directa entre gemcitabina y el silenciamiento de BPTF. Con el propósito de esclarecer el mecanismo subyacente, se optó por evaluar la expresión de los transportadores ABC, los cuales desempeñan un papel crucial en muchos de los procesos de quimiorresistencia asociados al ADP (Kang et al., 2009). Estudios previos realizados por Porro *et al.* demostraron que la regulación de dichos transportadores era mediada directamente por el oncogén c-MYC (Porro et al., 2010; Z. Wang et al., 2015). Estos hallazgos sustentaban la hipótesis de que el eje c-MYC-BPTF (Richart, Real, et al., 2016) podría regular la expresión de los transportadores ABC, y su interferencia podría aumentar la sensibilidad a gemcitabina.

Para validar esta premisa, se llevó a cabo un análisis de la correlación entre c-MYC, BPTF y la expresión de un conjunto de transportadores ABC utilizando datos obtenidos del Análisis Interactivo de Perfiles de Expresión Génica (GEPIA, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Los resultados revelaron una correlación positiva significativa en la expresión entre c-MYC, BPTF y los transportadores ABCC1, ABCC3 y ABCC4 (**Figura 15A**), señalando una correlación más marcada en dos de ellos (ABCC1 y ABCC4). Posteriormente, se examinó la expresión de estos transportadores en una cohorte de pacientes con ADP, evidenciando una clara sobreexpresión en el tejido tumoral pancreático en comparación con el tejido normal (**Figura 15B**).

**A**



**B**

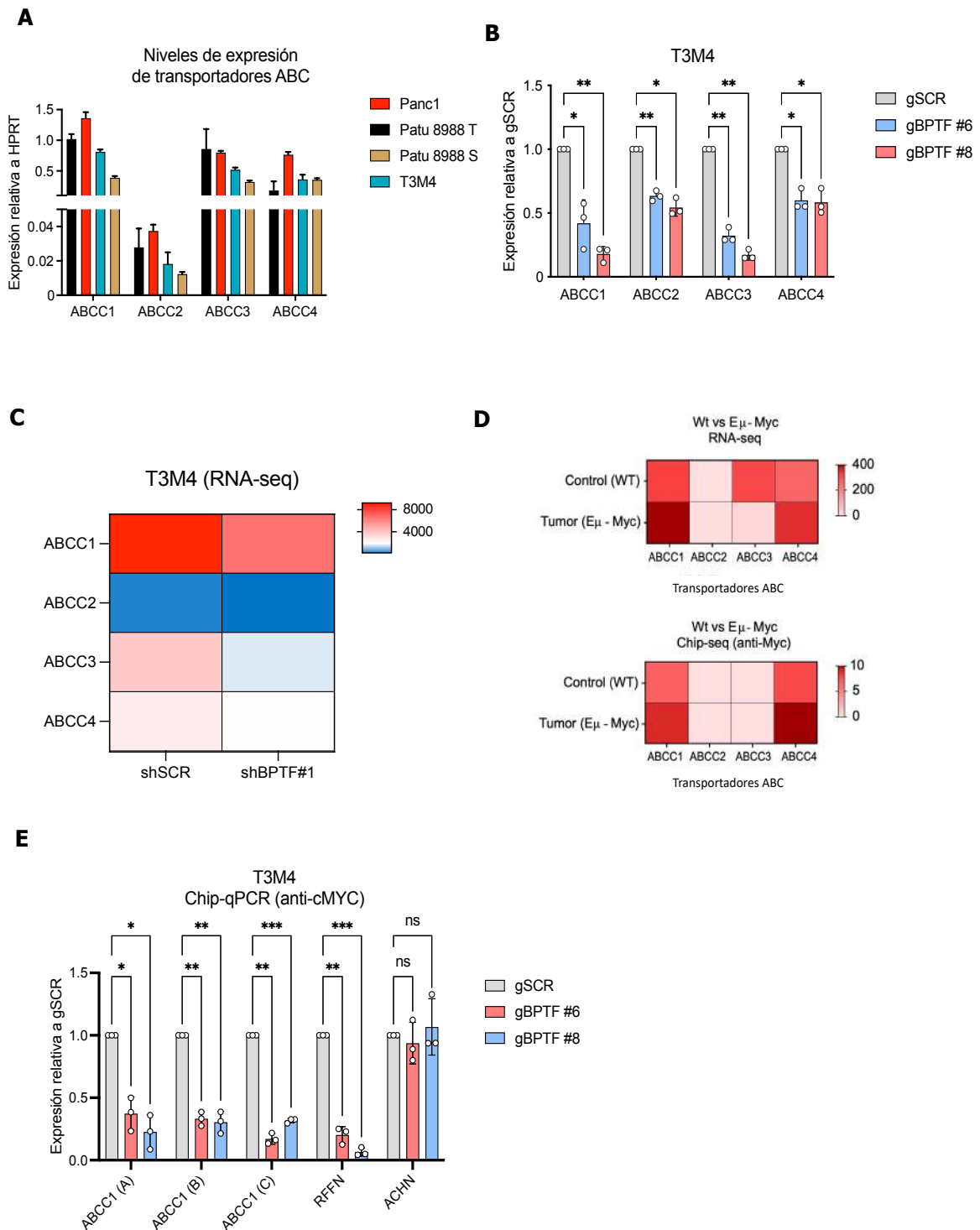
**Figura 15. BPTF se correlaciona directamente con la expresión de los transportadores ABC.** (A) Estudio en GEPIA de la correlación entre la expresión de los distintos transportadores ABC y BPTF y c-MYC. (B) Estudio de los niveles de expresión de los distintos transportadores ABC en pacientes con ADP del TCGA.

Para validar los resultados obtenidos, se estableció una correlación entre los niveles de BPTF y los transportadores ABC en el panel de líneas celulares de ADP. Los resultados indicaron que las líneas con una mayor expresión de BPTF también exhibían niveles elevados de cada uno de los transportadores (**Figura 16A**). Para corroborar esta correlación, se procedió a silenciar BPTF mediante CRISPRi en la línea de estudio T3M4 y se evaluó la expresión de cada uno de estos transportadores mediante qPCR en comparación con la línea control (gSCR) (**Figura 16B**). Además, del análisis la expresión de los transportadores en el RNA-seq tras el silenciamiento de BPTF mediante shRNA (shBPTF#1) frente a la secuencia control (shSCR) (**Figura 16C**). Los resultados confirmaron el papel de BPTF en la regulación de la expresión de los transportadores de membrana ABC.

Concorde a los datos obtenidos, se decidió investigar cómo c-MYC regula la expresión de los transportadores ABC en un modelo diferente al de páncreas. Se examinaron datos públicos disponibles del modelo de ratón E $\mu$ -Myc, de linfoma de Burkitt, y se observó que c-MYC se reclutaba directamente al promotor de ABCC1 y ABCC4 en los tumores en comparación con los controles, lo que correlacionaba con una mayor expresión (**Figura 16D**).

## Resultados

Para validar estos hallazgos en un modelo de ADP, se analizó el reclutamiento de c-MYC mediante ChIP-qPCR en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento de BPTF en comparación con la secuencia control (gSCR) para distintas regiones del gen ABCC1 (**Figura 16E**). Se observó una clara reducción en el reclutamiento de c-MYC después del silenciamiento de BPTF, lo que sugiere que BPTF es necesario para el acceso de c-MYC al promotor de ABCC1 y, por ende, para regular su expresión.



**Figura 16. El silenciamiento de *BPTF* modula la expresión de los transportadores ABC.** (A) Estudio de los niveles de expresión por qPCR de los cuatro transportadores (ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4) en las líneas de ADP a estudio (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). (B) Estudio de los niveles de expresión por qPCR de los distintos transportadores ABC tras el silenciamiento de *BPTF* con los dos guides a estudio (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). (C) Análisis de la expresión de los transportadores a estudio por RNA-seq tras el silenciamiento de *BPTF* mediante shRNA (shBPTF#1) frente a la secuencia control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs shBPTF#1). (D) Experimento de RNA-seq y Chip-seq de los cuatro transportadores a estudio en el modelo Eu-Myc de linfomagénesis. (E) Estudio por Chip-qPCR de tres lugares de unión a ABCC1 por Myc tras el silenciamiento de *BPTF* con los dos guides a estudio (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con la secuencia control (gSCR) en la línea celular T3M4 (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

- **El silenciamiento de *BPTF* aumenta la retención de calceína intracelular**

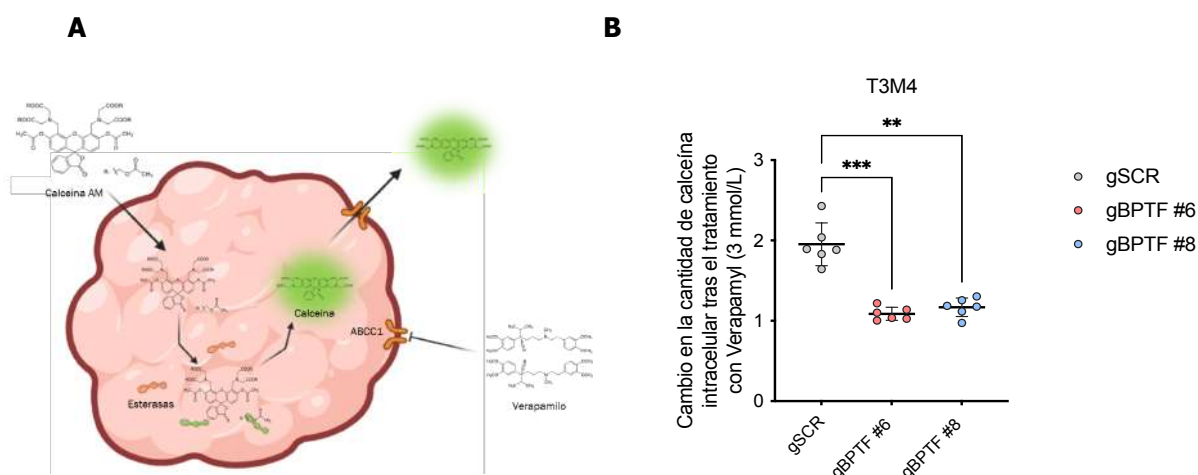
La reducción de la expresión de los transportadores de membrana (ABC) como resultado del silenciamiento de *BPTF* podría impactar en la extrusión de gemcitabina. Este agente quimioterapéutico, al actuar como análogo de nucleótidos, interfiere con la replicación del ADN, y su acción se vería prolongada dentro de la célula tras el silenciamiento de *BPTF*, lo que incrementaría el daño al ADN.

Para validar esta hipótesis, se empleó un inhibidor específico de la glicoproteína P y de varios transportadores ABC, entre los que se encuentra ABCC1, como es el Verapamilo, en conjunto con un ensayo de calceína-AM. La calceína-AM es una sustancia química que ingresa pasivamente a la célula a través de la membrana; una vez en el interior, se convierte en calceína, una molécula fluorescente que es posteriormente expulsada de la célula mediante transportadores ABC. La presencia de Verapamilo en el medio bloquearía la salida de esta molécula fluorescente por los transportadores, prolongando así su retención dentro de la célula (**Figura 17A**).

Los resultados obtenidos revelaron que las células control (gSCR) tratadas con calceína-AM y Verapamilo exhibían casi el doble de retención de calceína intracelular en comparación con las células control sin Verapamilo. Esto se debe a la incapacidad de las células para extruir el colorante debido al bloqueo de los transportadores ABC por el Verapamilo. Por otro lado, las células con silenciamiento de *BPTF*, al presentar una reducción en la expresión de los transportadores ABC, no mostraron cambios en la cantidad de calceína intracelular retenida tras el tratamiento con Verapamilo en

## Resultados

comparación con las células sin tratamiento. Esto se debe a la reducción de la expresión de los transportadores diana del Verapamilo (**Figura 17B**).



**Figura 17. El silenciamiento de *BPTF* dificulta la salida de calceína del interior celular. (A)** Esquema representativo del proceso de entrada de calceína-AM al interior celular, su metabolización a calceína y posterior salida por los transportadores ABC. **(B)** Estudio del cambio en la entrada de calceína intracelular tras el tratamiento con Verapamilo, de células interferidas para BPTF (gBPTF#6 y gBPTF#8) frente a aquellas con la secuencia control (gSCR) en la línea celular de ADP T3M4 (Media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ , gSCR vs gBPTF#6 y gBPTF#8). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

Estos resultados apuntan a una correlación directa entre la regulación de los transportadores ABC por parte de BPTF y la acumulación intracelular de gemcitabina. Sugieren que la disminución de los transportadores ABC debido al silenciamiento de BPTF podría conducir a una mayor retención de gemcitabina dentro de las células, lo que potencialmente aumentaría el daño al ADN y por tanto su eficacia terapéutica contra el ADP.

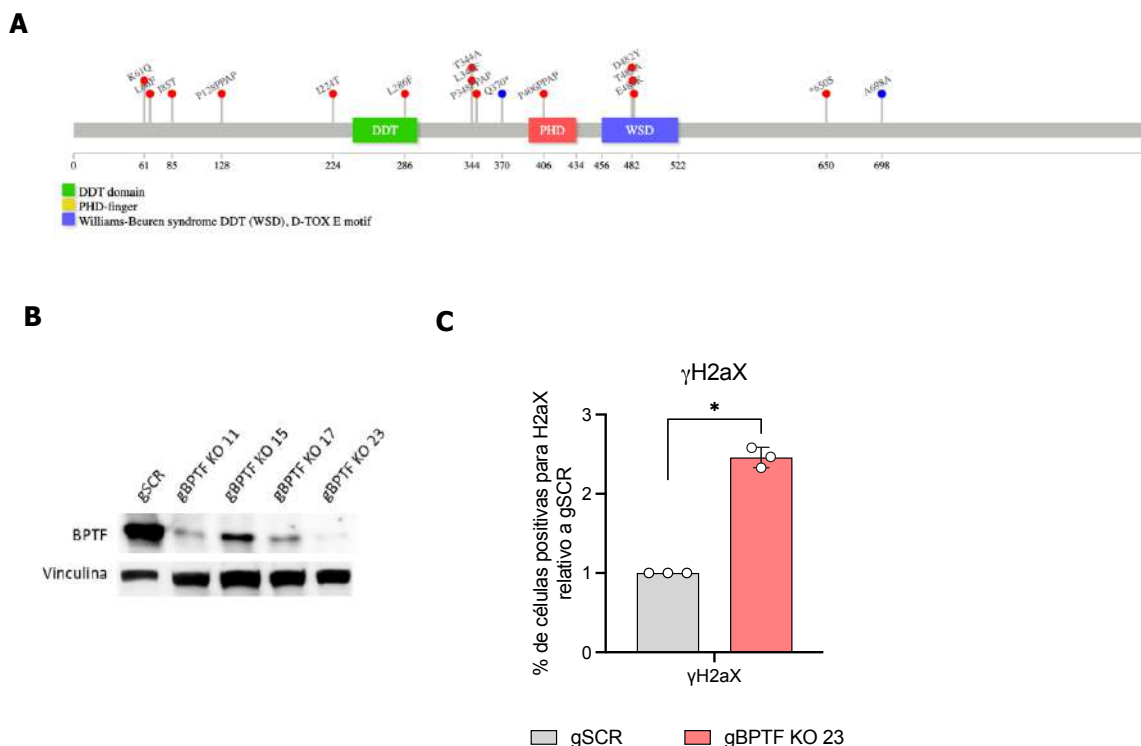
- **La delección de BPTF produce un aumento de daño al ADN**

La posible acumulación de gemcitabina en el interior celular tras el silenciamiento de BPTF abre una nueva perspectiva para explorar la letalidad sintética asociada al daño al ADN por la combinación de gemcitabina y el silenciamiento de BPTF. Un estudio realizado por Gong F *et al.* relacionó a BPTF con los procesos de reparación del ADN, demostrando cómo, después de incidir con un micro rayo láser en células humanas, se observó un aumento en la movilidad de proteínas intracelulares hacia la zona de daño,

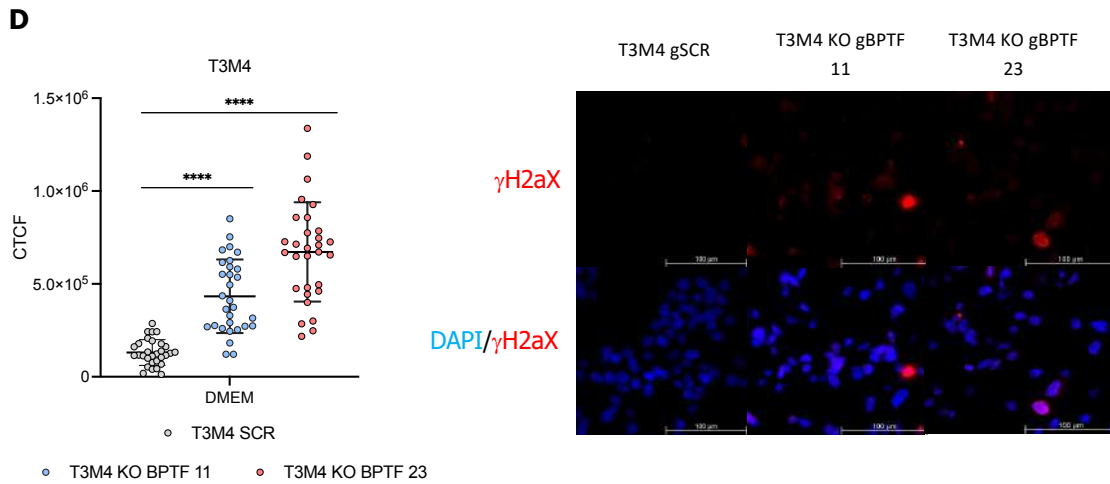
donde se encontraba BPTF. Este hallazgo sugiere una posible implicación de BPTF en los procesos de reparación del ADN (Gong et al., 2015).

Teniendo en cuenta estos resultados, se examinó cómo la delección de BPTF afecta al daño al ADN. Inicialmente, se evaluó el porcentaje de pacientes con ADP que presentaban mutaciones truncantes en BPTF. Los resultados revelaron que aproximadamente el 2,2% de los pacientes con ADP, equivalente a alrededor de 10.000 pacientes anuales (Ilic et al., 2022), presentaban mutaciones truncantes en este gen, lo que sugiere que podrían beneficiarse de la letalidad sintética propuesta (**Figura 18A**).

Para investigar estos hallazgos in vitro, se procedió a la delección de BPTF mediante la CRISPR en la línea celular T3M4. Una vez que las células fueron infectadas, se seleccionaron los clones mediante dilución límite y se evaluó la expresión de BPTF mediante Western blot (**Figura 18B**). Posteriormente, se seleccionaron los clones con una reducción significativa en la expresión de BPTF (Clon gBPTF 11 y Clon gBPTF 23), y se llevó a cabo una tinción de  $\gamma$ H2aX, histona fosforilada que indica daño al ADN. Tanto mediante citometría (**Figura 18C**) como mediante inmunofluorescencia (**Figura 18D**), se observó un aumento en la expresión de este marcador en las células deficientes en BPTF, lo que indica que la inhibición de BPTF conlleva un aumento del daño al ADN.



## Resultados

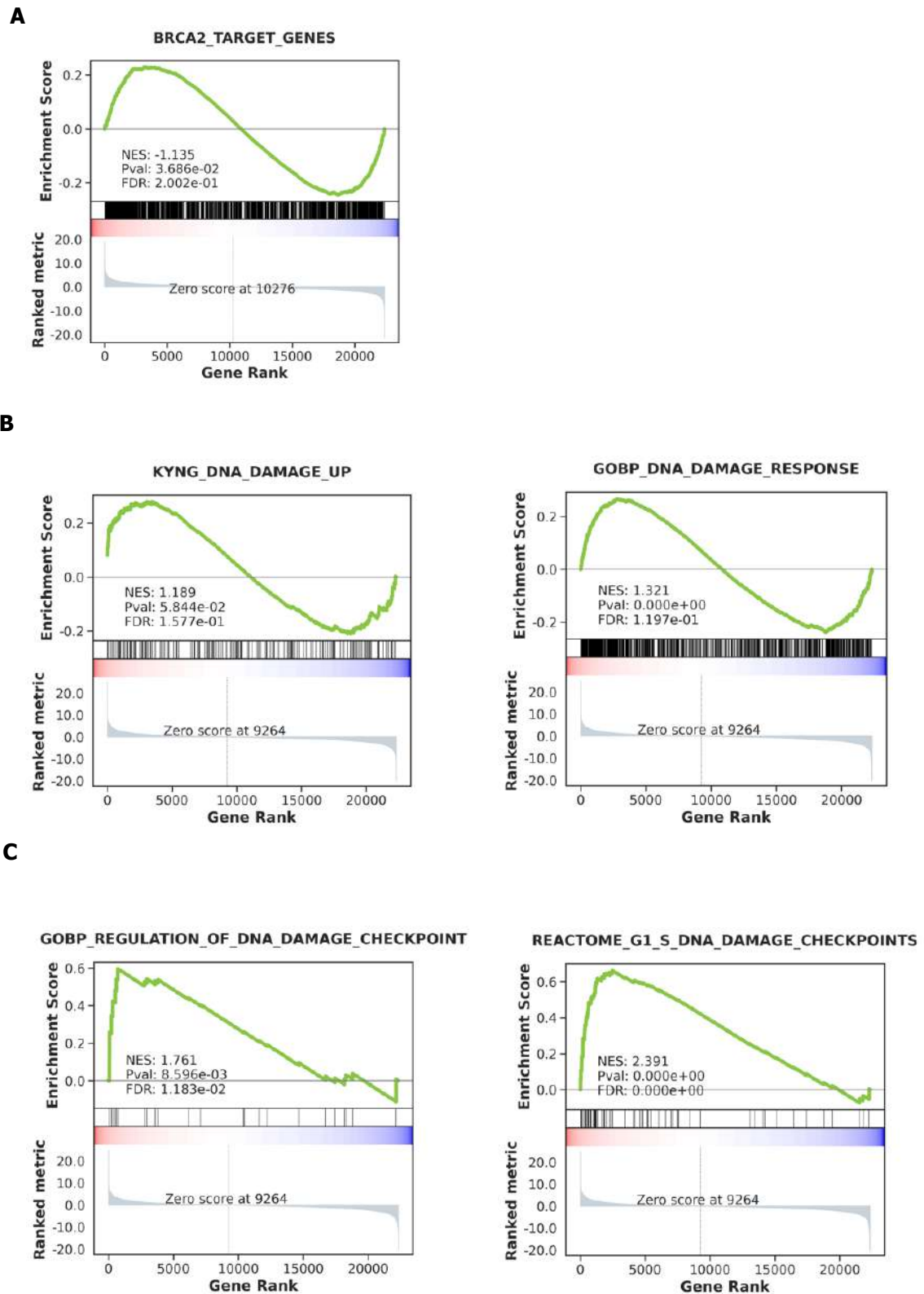


**Figura 18. La delección de BPTF aumenta los niveles de daño al ADN.** (A) Análisis del porcentaje de pacientes con ADP del TCGA que presentan mutaciones truncantes en BPTF. (B) Niveles de expresión de BPTF por WB en la línea celular T3M4, tras la generación de clones con oligos dirigidos contra BPTF (gBPTF KO) o con secuencia irrelevante (gSCR). (C) Análisis del porcentaje de células positivas para gH2AX por citometría en células control (gSCR) frente a aquellas con delección de BPTF (gBPTF) (Media ± SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF KO 23). (D) Nivel de fluorescencia de  $\gamma$ H2AX en células en células control (gSCR) frente a aquellas con delección de BPTF (gBPTF KO 11 y gBPTF KO 23) (Media ± SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF KO 11 y gBPTF KO 23). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

Para respaldar y validar de manera precisa el efecto de BPTF sobre el daño al ADN, se llevó a cabo un análisis de RNA-seq después del silenciamiento de BPTF mediante shRNA (shBPTF#1), en comparación con la secuencia control (shSCR). Con el objetivo de evaluar las implicaciones funcionales de esta inhibición, se realizaron una serie de Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos Genéticos (GSEAs). Estos análisis indicaron un menor enriquecimiento de los genes asociados a BRCA2 en las células con silenciamiento de BPTF (**Figura 19A**), lo que sugiere una posible implicación de BPTF en la regulación de la actividad de BRCA2, por consiguiente, un aumento del daño al ADN debido a la disminución de la expresión de proteínas de reparación asociadas con esta vía (**Figura 19B**).

Por último, se investigó si el aumento del daño contribuía a la parada del ciclo celular en las células deficientes en BPTF. Los resultados mostraron un mayor enriquecimiento de los genes asociados a los puntos de control del ciclo celular,

específicamente relacionados con la transición de la fase G1 a la fase S, en las células no silenciadas (**Figura 19C**). Esto sugiere una parada celular mediada por el daño al ADN en las células deficientes en BPTF. Estos hallazgos respaldan aún más el papel crítico de BPTF en la integridad del ADN y la regulación del ciclo celular.



### **Figura 19. El silenciamiento de BPTF regula la expresión de genes asociados a daño al ADN.**

Experimentos de RNA-seq de células T3M4 interferidas para BPTF (shBPTF#1) frente a secuencia control (shSCR) ( $n = 3$ , gSCR vs shBPTF#1). **(A)** GSEA de genes relacionados con BRCA2, observándose un NES negativo indicando un menor enriquecimiento de estas rutas tras el silenciamiento de BPTF **(B)** GSEA de genes relacionados con daño al ADN, observándose un NES positivo indicando un mayor enriquecimiento de estas rutas tras el silenciamiento de BPTF. **(C)** GSEA de genes relacionados con regulación de los puntos de control de ciclo debidos al daño al ADN, observándose un NES positivo indicando un menor enriquecimiento de estas rutas tras el silenciamiento de BPTF.

- **La inhibición de BPTF acentúa el efecto de la gemcitabina**

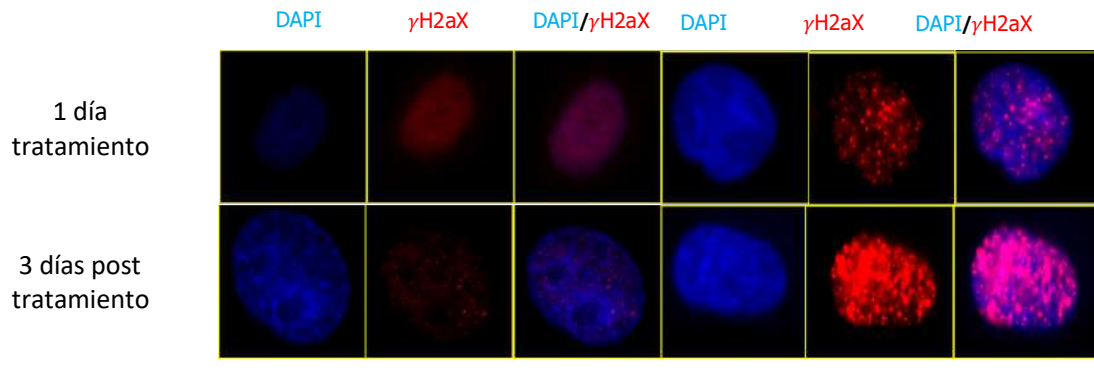
Una vez confirmado que la inhibición de BPTF conllevaba un incremento del daño al ADN, se investigó el efecto del tratamiento con gemcitabina en células deficientes para BPTF. Se llevaron a cabo ensayos funcionales donde las células deficientes en BPTF fueron tratadas con gemcitabina a una concentración cercana a la IC50 (0.5  $\mu$ M) durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el tratamiento y se permitió a las células recuperarse durante 72 horas en medio fresco, con el fin de observar si el aumento del tiempo de exposición a la gemcitabina, debido a su acumulación, se asociaba con un incremento del daño al ADN y si la delección de BPTF, dificultaba por tanto la reparación del daño al ADN. Esta hipótesis se evaluó mediante un ensayo de inmunofluorescencia donde se calculó el porcentaje de fluorescencia de  $\gamma$ H2aX en uno de los clones estudiados (Clon gBPTF 23) en comparación con el control (gSCR). Los resultados indicaron que las células deficientes en BPTF no eran capaces de revertir el daño después de 72 horas de recuperación, e incluso mostraron un aumento del mismo (**Figura 20A**).

Para validar estos resultados, se llevó a cabo un experimento de un día de tratamiento sin recuperación con células T3M4 con silenciamiento de BPTF mediante CRISPRi. Se observó que el tratamiento de un día con gemcitabina aumentaba el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2aX (**Figura Suplementaria 3**).

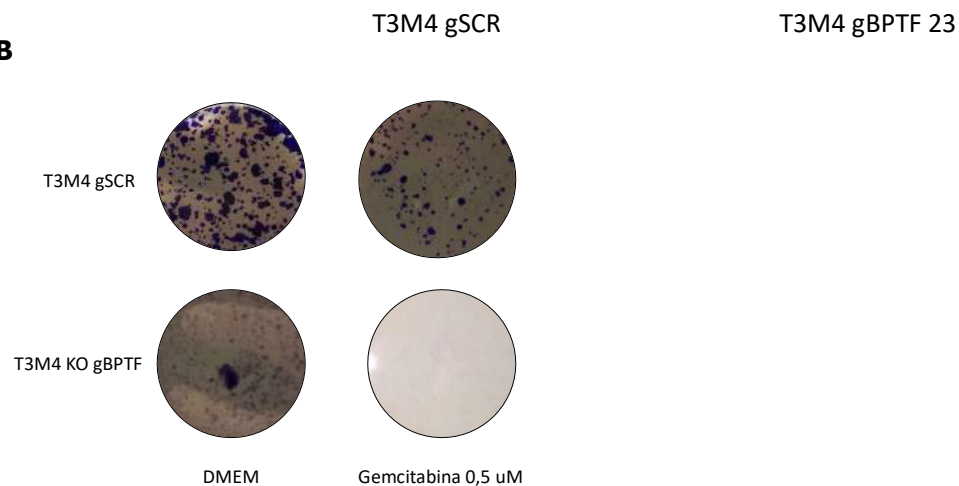
Para corroborar los hallazgos, se realizó un ensayo de formación de colonias (**Figura 20B**), que demostró una reducción significativa en el índice de crecimiento en las células con delección de BPTF (Clon gBPTF 23) y tratamiento de 24 horas con gemcitabina en comparación con la línea control (gSCR).

En resumen, estos resultados evidencian un aumento del daño al ADN en ausencia de BPTF y después del tratamiento con gemcitabina, lo que sugiere una posible dificultad en los procesos de reparación asociados.

**A**



**B**



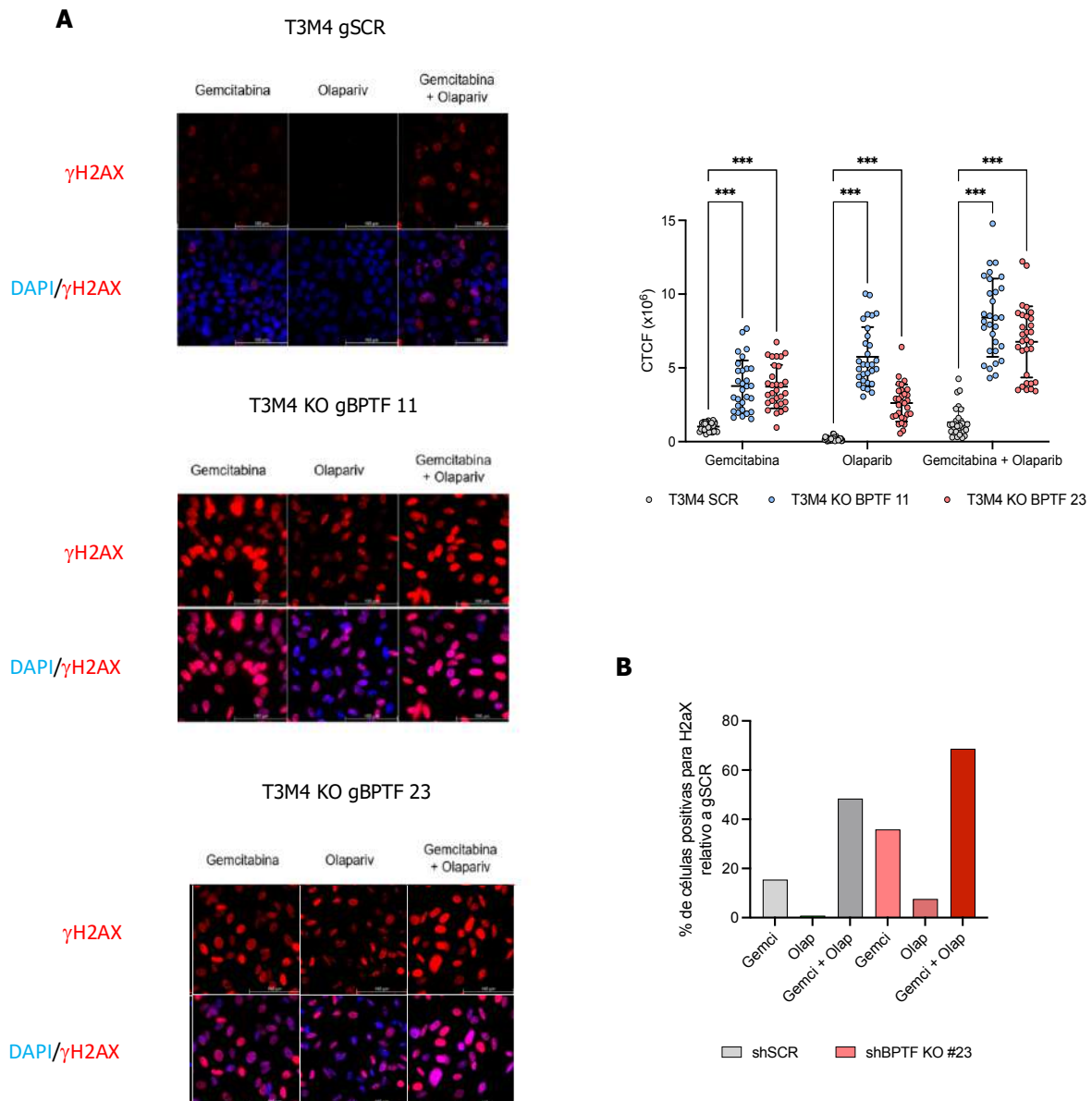
**Figura 18. BPTF es necesario para el proceso de reparación del DNA.** (A) Estudio del marcador de daño  $\gamma$ H2AX por inmunofluorescencia tras el tratamiento con gemcitabina (0,5 mM) durante 24 horas y su posterior recuperación en medio normal durante 72 horas en las dos líneas de estudio (gSCR y KO gBPTF#23) ( $n = 3$ , gSCR vs gBPTF KO 23). (B) Ensayo de colonias tras el tratamiento con gemcitabina (0,5  $\mu$ M) y su posterior recuperación durante 14 días en las dos líneas de estudio (gSCR y KO gBPTF#23).

- **La terapia combinada de inhibidores de PARP, gemcitabina y delección de BPTF aumenta el daño al ADN**

Se han desarrollado tratamientos clínicos basados en el uso de inhibidores de PARP (PARPi) para el tratamiento de tumores con mutaciones en vías de reparación del ADN, como el uso de olaparib en el cáncer de mama con mutaciones en BRCA2 (Griguolo et al., 2018). Los resultados anteriores han demostrado una disminución en el enriquecimiento de genes asociados a BRCA2, lo que dificulta la reparación del ADN relacionada con estas vías y podría sensibilizar a las células al tratamiento con inhibidores de PARP (PARPi), como olaparib.

Se llevaron a cabo tratamientos en células T3M4 control y deficientes para BPTF con olaparib solo o en combinación con gemcitabina. Se observó un claro aumento del daño en las células con delección de BPTF en comparación con el control después del tratamiento con olaparib, el cual se acentuaba aún más tras la terapia combinada con gemcitabina, tanto por inmunofluorescencia como por citometría (**Figura 21A y B**).

Los resultados obtenidos sugieren una posible nueva estrategia de terapia combinada en pacientes con ADP que presenten mutaciones truncantes de BPTF, utilizando gemcitabina y olaparib. Este enfoque terapéutico podría ofrecer nuevas opciones para mejorar el tratamiento y la gestión de esta enfermedad.

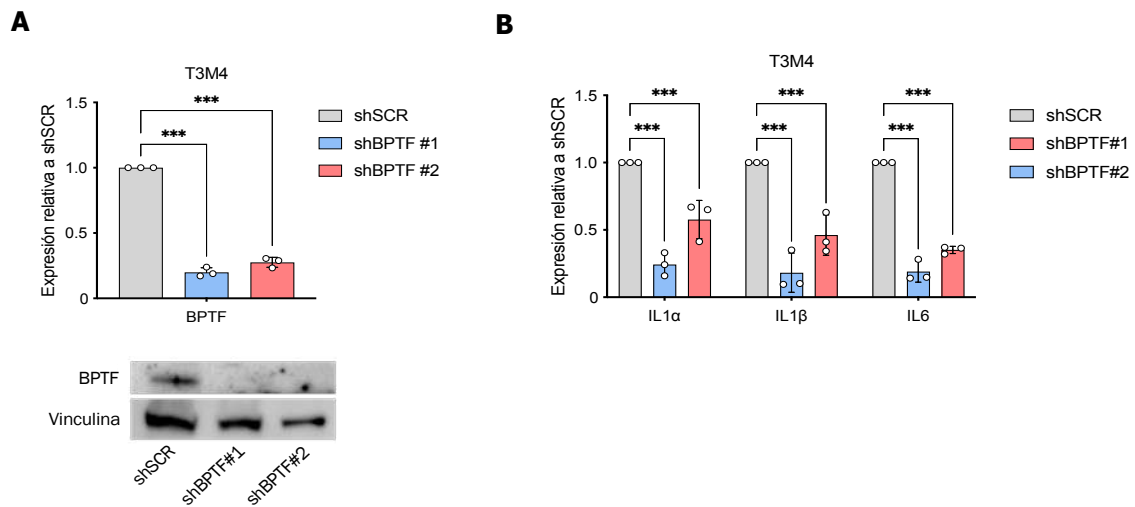


**Figura 21. Letalidad sintética en ADP tras la delección de BPTF. (A)** Estudio de la intensidad de fluorescencia de  $\gamma$ H2AX por inmunofluorescencia, tras el tratamiento con gemcitabina (0,5  $\mu$ M), olaparib (1  $\mu$ M) o la combinación durante 24 horas en las tres líneas a estudio (gSCR, KO gBPTF 11 y KO gBPTF 23) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , gSCR vs gBPTF KO 11 y gBPTF KO 23) **(B)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia (CTCF) de  $\gamma$ H2AX tras tratamiento con gemcitabina (0,5  $\mu$ M), olaparib (1  $\mu$ M) o la combinación durante 24 horas de en las tres líneas a estudio (gSCR, KO gBPTF 11 y KO gBPTF 23) **(C)** Estudio de los niveles de porcentaje de las células positivas para  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo, tras tratamiento con gemcitabina (0,5  $\mu$ M), olaparib (1  $\mu$ M) o la combinación durante 24 horas en las dos líneas de estudio (gSCR y KO gBPTF#23). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

- **BPTF es necesario para la expresión de citoquinas inflamatorias.**

Una vez se confirmó el papel de BPTF en los procesos de proliferación y sensibilidad a la gemcitabina, se decidió investigar su implicación en la remodelación del microambiente tumoral. Estudios previos realizados por Sodir et al. demostraron cómo c-MYC es necesario para la modulación de la expresión de ciertas citoquinas inflamatorias (Sodir et al., 2011, 2019). Con esta premisa, se planteó la hipótesis de que esta regulación proteica pudiera depender de igual manera por la expresión de BPTF.

Para abordar esta cuestión, se silenció la expresión de BPTF en las células T3M4 utilizando dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2), y se compararon con células que contenían una secuencia control irrelevante (shSCR) (**Figura 22A**). Una vez confirmado el silenciamiento de BPTF, se evaluó mediante qPCR la expresión de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. Los resultados revelaron cómo el silenciamiento de BPTF generaba una reducción en la expresión de estas citoquinas pro tumorales (**Figura 22B**).

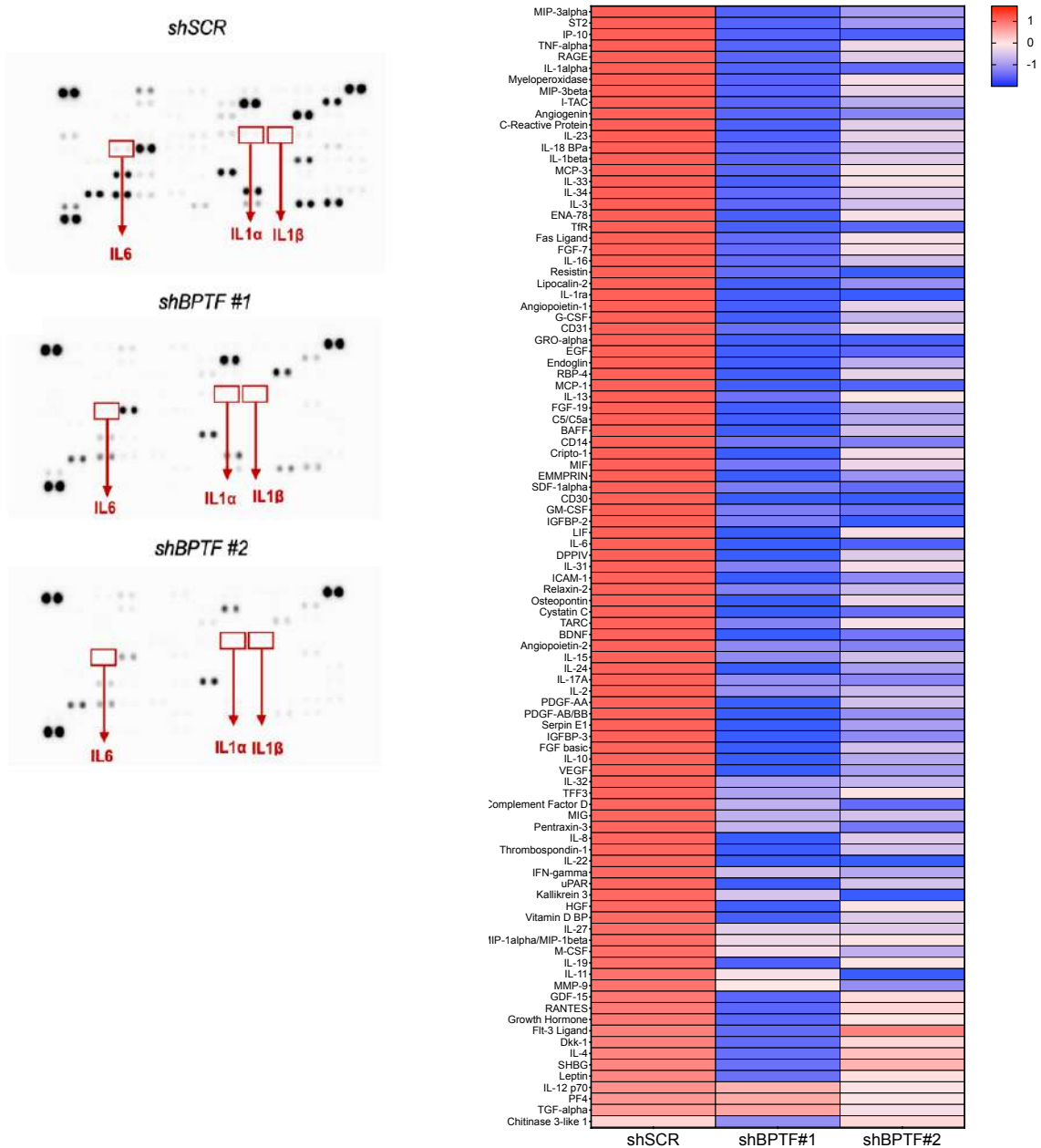


**Figura 22. El silenciamiento de *BPTF* disminuye la expresión de citoquinas inflamatorias. (A)**

Niveles de expresión de BPTF en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) por qPCR y Western Blot (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). **(B)** Niveles de expresión por qPCR de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

Con el fin de ampliar el panel de citoquinas potencialmente reguladas por BPTF, se procedió a realizar un análisis de 105 citoquinas a través de un array, utilizando el medio condicionado de células en las que se había silenciado la expresión de BPTF, en contraste con células control. Los resultados del array arrojaron una disminución generalizada en los niveles de citoquinas, entre las que se incluyeron IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 (**Figura 23**). Este descubrimiento resalta el posible papel de BPTF en la regulación de la expresión de diversas citoquinas en el microambiente tumoral.

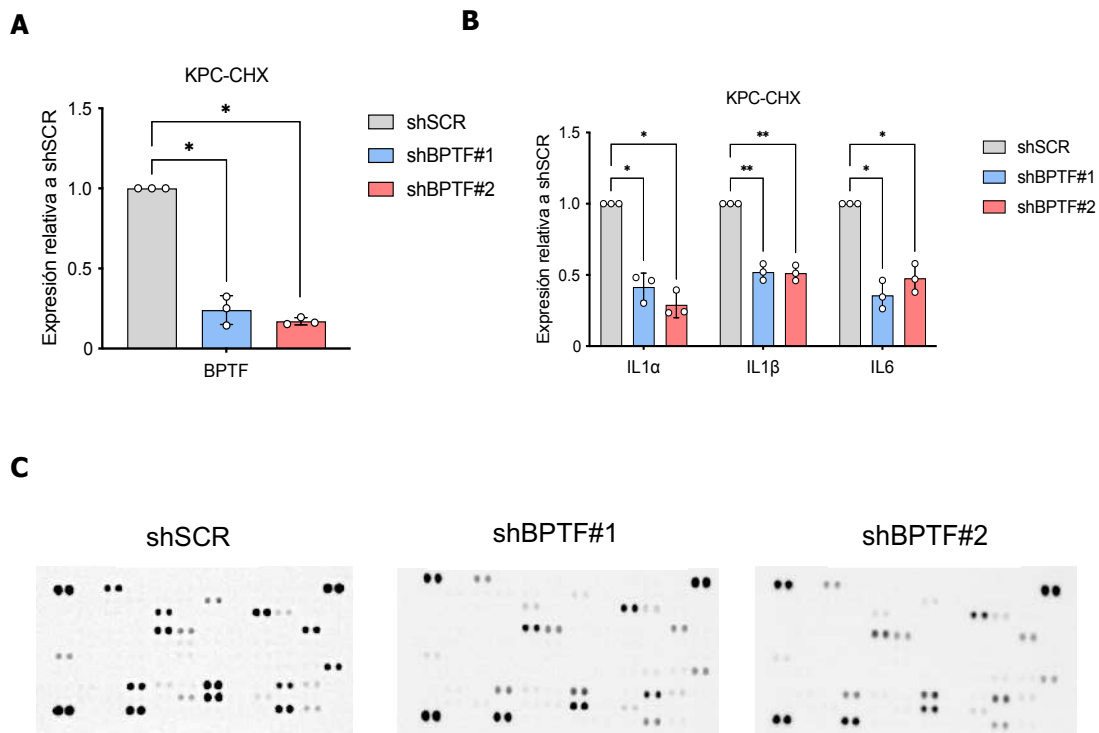
T3M4

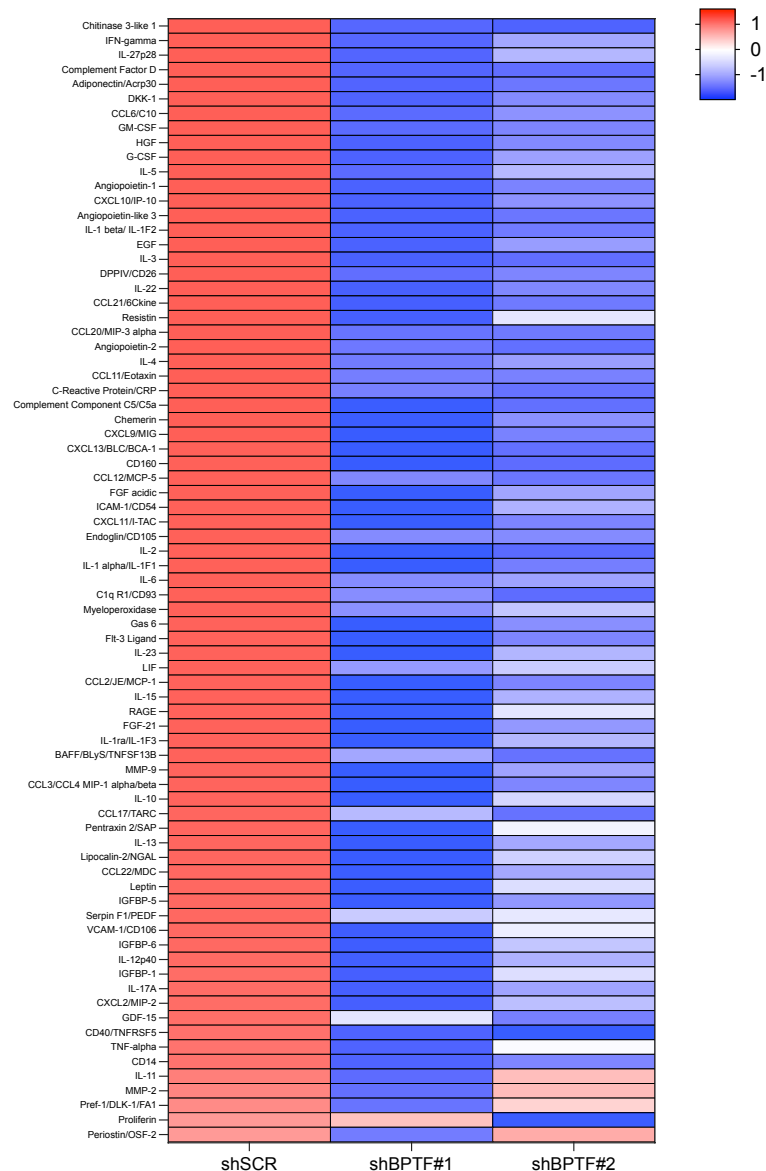


## Resultados

**Figura 23. El silenciamiento de *BPTF* disminuye los niveles de citoquinas inflamatorias extracelulares.** Membranas y *heatmap* representativo de los niveles de expresión de un panel de 105 citoquinas inflamatorias en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Se considera una significancia estadística cuando el valor de p es menor a: \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005.

Para respaldar los datos previos humanos en el modelo murino, se evaluó la expresión de citoquinas inflamatorias reguladas por BPTF. Se procedió al silenciamiento de la expresión de BPTF mediante shRNA en comparación con una secuencia control (shSCR) (**Figura 24A**), y se analizó su expresión mediante qPCR (**Figura 24B**). Estos hallazgos se confirmaron a nivel proteico mediante un array de citoquinas posterior al silenciamiento de BPTF (**Figura 24C**).





**Figura 24. El silenciamiento de *BPTF* modula la expresión de las citoquinas en el modelo murino de ADP. (A)** Niveles de expresión por qPCR de *BPTF* en la línea celular murina KPC-CHX tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) por qPCR (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). **(B)** Niveles de expresión por qPCR de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 en la línea celular murina KPC-CHX tras el silenciamiento de *BPTF* con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). **(C)** Membranas y *heatmap* representativo de los niveles de expresión de un panel de 105 citoquinas inflamatorias en la línea celular murina KPC-CHX tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

En base a los resultados obtenidos, se buscó validar si los dos conjuntos de datos mediante arrays, tanto a nivel humano como murino, mostraban una correlación en la regulación de la expresión de las citoquinas (**Figura Suplementaria 5**). Los resultados demuestran que el efecto del silenciamiento de BPTF es reproducible tanto en modelos humanos como en modelos murinos, sugiriendo una posible implicación de este en la regulación de la expresión de citoquinas.

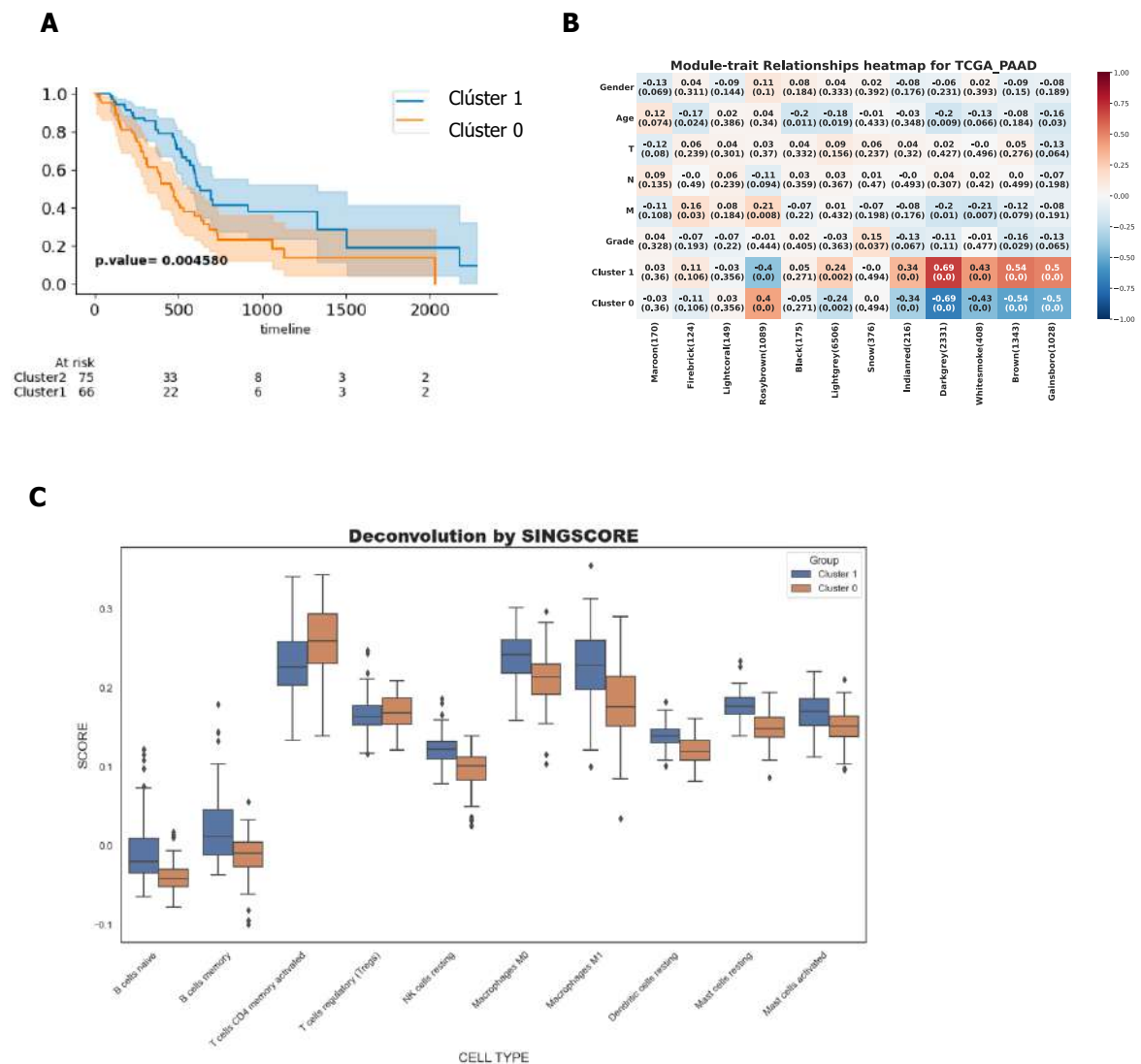
- **Papel del microambiente tumoral en ADP**

Los resultados que se obtuvieron anteriormente demostraron como BPTF modulaba la expresión de ciertas citoquinas cuya función, entre otras, es modificar el reclutamiento, polarización y actividad de diversas poblaciones inmune. Es por ello que se decidió caracterizar en pacientes posible papel del microambiente tumoral y en la tumorigenicidad del ADP.

Utilizando una cohorte de pacientes de ADP disponibles en el repositorio TCGA se llevó a cabo un *clustering* no supervisado de tipo Gaussiano detectándose claramente dos grupos (**Figura 25A y Figura Suplementaria 5A**). Se evaluó la supervivencia en ambos grupos mediante curvas de Kaplan Meier observándose que el clúster 0 presentaba una peor supervivencia (Long-Rank test 0,0045). A continuación, se llevó a cabo una expresión diferencial entre los dos grupos, representado mediante un Volcano Plot, donde se podía observar la bajada de la expresión varias de las citoquinas presentes en el array realizado anteriormente (**Figura Suplementaria 5B**). Con el objetivo de encontrar grupos de genes co-regulados de forma diferencial en los dos grupos se realizó un análisis de WGCNA. La caracterización de los módulos identificados, especialmente Darkgrey y Brown, mostraron un enriquecimiento el clúster 1 en comparación con el 0 (**Figura 25B**). El estudio del perfil de enriquecimiento demostró que el módulo *Darkgrey* estaba más relacionado con procesos metastáticos (**Figura Suplementaria 5C**), mientras que el módulo *Brown*, con procesos de remodelación del microambiente tumoral (**Figura Suplementaria 5D**), apoyando la idea de cómo el microambiente tumoral tiene un papel primordial en la supervivencia asociada al ADP.

Por último, para inferir las distintas poblaciones celulares dentro de cada grupo, se realizó un análisis de deconvolución. Los resultados demostraron como existía una modulación de las poblaciones inmunes en pacientes con ADP, presentando el clúster 1

un aumento de células del SI anti-tumorales y reducción de las pro-tumorales con respecto al clúster 0 (**Figura 25C**).



**Figura 25. Estudio del papel del microambiente tumoral en pacientes con ADP.** (A) Representación de la supervivencia asociada a pacientes con ADP tras una clusterización del tipo Gaussiano donde se separaron en dos grupos diferenciados en su supervivencia. (B) Perfil de enriquecimiento por módulos de distintas condiciones a estudio como son edad, sexo, estadio de la enfermedad y los dos clústeres obtenidos. (C) Decombolcion de los dos clústeres a estudio, donde se pueden observar las diferentes poblaciones del sistema inmune que se encuentran estadísticamente enriquecidas en alguno de los dos clústeres.

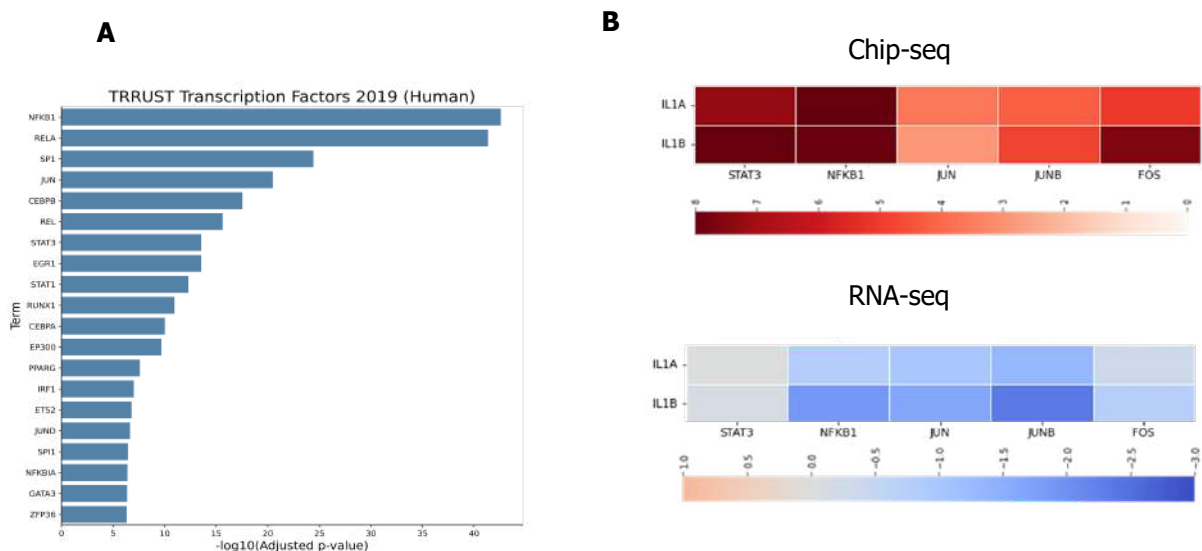
Estos resultados en conjunto de pacientes resaltan el papel crucial del microambiente tumoral en la tumorigenicidad del ADP y, por ende, en la supervivencia asociada al mismo. En línea con los resultados obtenidos, donde BPTF regula la expresión de citocinas responsables, entre otros aspectos, de la quimioatracción de poblaciones

## Resultados

del sistema inmune protumorales, la inhibición de BPTF podría generar un contexto más antitumoral, mejorando así la supervivencia y el tratamiento frente a la enfermedad.

- **BPTF regula la expresión de las citoquinas de la ruta de NFκB**

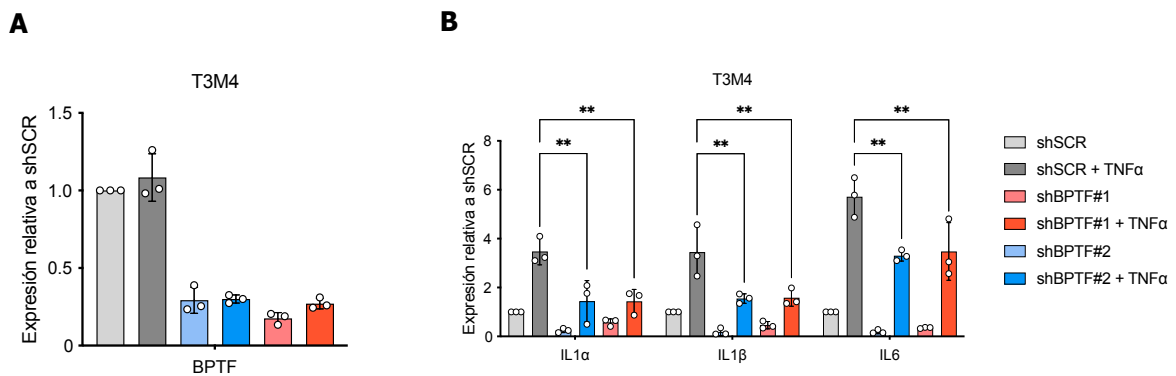
Con el propósito de identificar nuevos factores de transcripción dependientes de BPTF responsables de la regulación de citoquinas, aparte de c-MYC, se llevó a cabo un análisis bioinformático utilizando la base de datos "TRRUST Transcription Factors 2019", junto con la herramienta "Enrichr". Este análisis permitió identificar a NFκB1 y RelA como los principales reguladores de la expresión de citoquinas del array (**Figura 26A**). Para respaldar este resultado, se utilizaron los datos de Ji et al. (2019) sobre cáncer de mama, donde se evidenciaba en experimentos de Chip-seq y RNA-seq, la correlación directa entre NFκB y IL1α e IL1β (**Figura 26B**).



**Figura 26. NFκB es el principal factor de transcripción regulador del panel de citoquinas a estudio. (A)** Representación de los distintos factores de transcripción asociados a la regulación de las citoquinas de estudio **(B)** Estudio de Chip-Seq y RNA-seq, tras realizar el KO de STAT3, NFκB, JUN, JUNB y FOS, de IL1α e IL1β en cáncer de mama.

Tras evidenciar cómo un amplio panel de las citoquinas del array estaban reguladas por NFκB, con especial atención en IL1α e IL1β, se procedió a analizar su respuesta al TNFα y determinar si esta dependía de NFκB y BPTF. En primer lugar, se confirmó que el tratamiento con TNFα no afectaba al silenciamiento de BPTF (**Figura 27A**). Posteriormente, se examinó la respuesta de las citoquinas de interés al TNFα en

presencia y ausencia de BPTF. Todos los genes estudiados exhibieron un incremento en su expresión en respuesta al TNF $\alpha$ , el cual se vio significativamente reducido tras el silenciamiento de BPTF (**Figura 27B**).



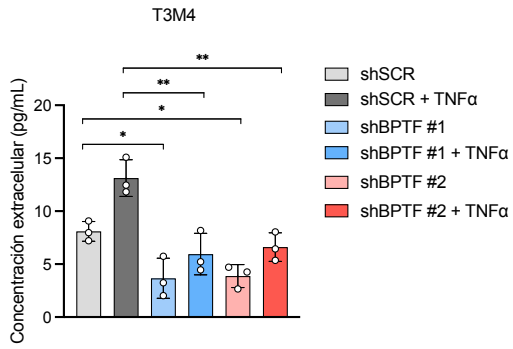
**Figura 27. El tratamiento con TNF $\alpha$  modula la expresión de las citoquinas tras el silenciamiento de BPTF.** (A) Niveles de expresión por qPCR de BPTF tras el tratamiento con TNF $\alpha$  en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) por qPCR (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2 con y sin tratamiento). (B) Niveles de expresión por qPCR de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 en la línea celular T3M4 tras el tratamiento con TNF $\alpha$  y el silenciamiento de BPTF con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2 con y sin tratamiento). Se considera una significancia estadística cuando el valor de  $p$  es menor a: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

Para respaldar estos hallazgos a nivel proteico, se evaluaron los niveles de IL1 $\alpha$  secretada mediante ELISA y se repitió el array de citoquinas tras del tratamiento con TNF $\alpha$ . Los resultados del ELISA revelaron cómo el silenciamiento de BPTF afectaba la liberación de IL1 $\alpha$  por parte de las células tumorales tras el tratamiento con TNF $\alpha$  (**Figura 28A**). Para facilitar el análisis del array (**Figura 28B**), las citoquinas se dividieron en dos grupos distintos: uno que mostraba un aumento en su expresión en respuesta al TNF $\alpha$  y otro que experimentaba cambios exclusivamente tras el silenciamiento de BPTF. Ambos grupos se caracterizaron mediante un diagrama de Venn (**Figura 28C**), donde se distinguieron tres grupos de interés:

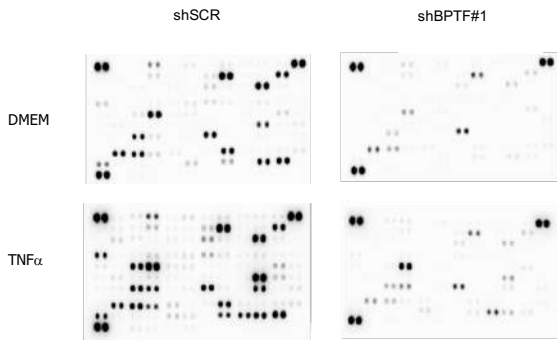
- Grupo 1: Citoquinas reguladas por BPTF que mostraban una respuesta reducida al tratamiento con TNF $\alpha$  (**Figura 28D**).
- Grupo 2: Citoquinas reguladas por BPTF cuya expresión no cambiaba tras el tratamiento con TNF $\alpha$  (**Figura 28E**).
- Grupo 3: Citoquinas cuya expresión variaba con el tratamiento con TNF $\alpha$  pero que no eran sensibles al silenciamiento de BPTF (**Figura 28F**).

# Resultados

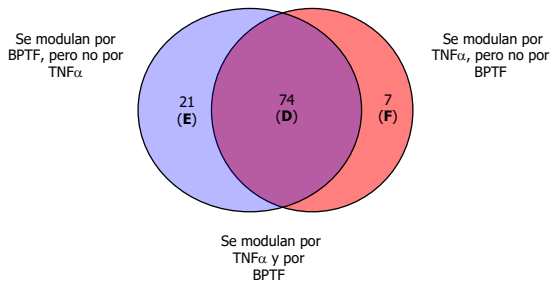
**A**



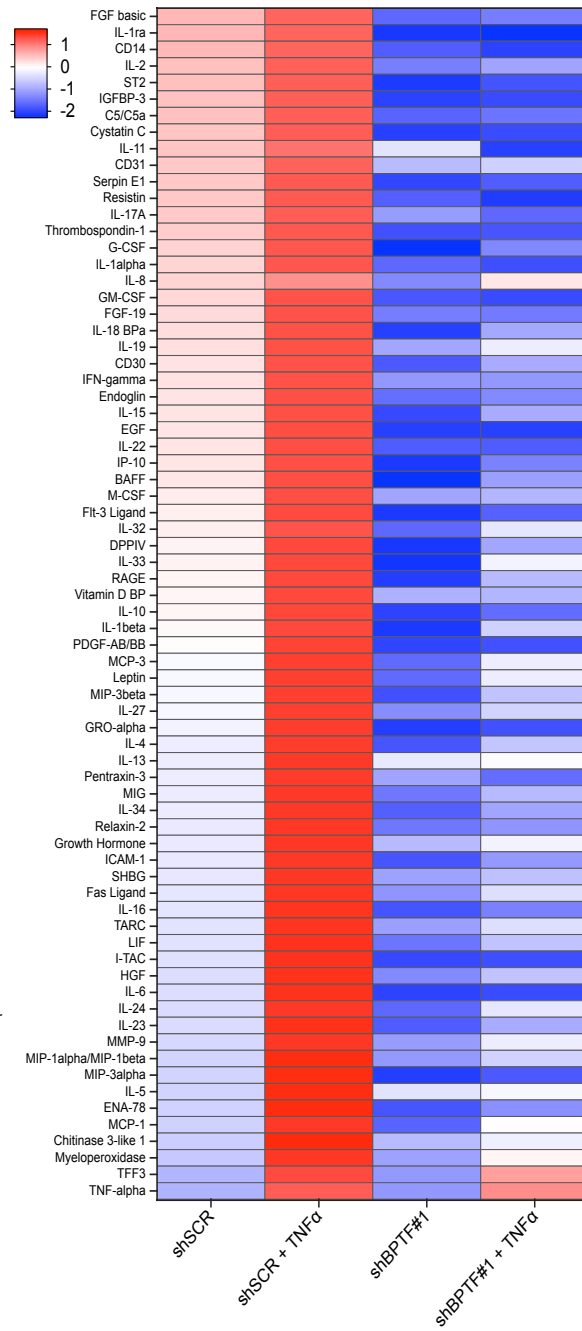
**B**

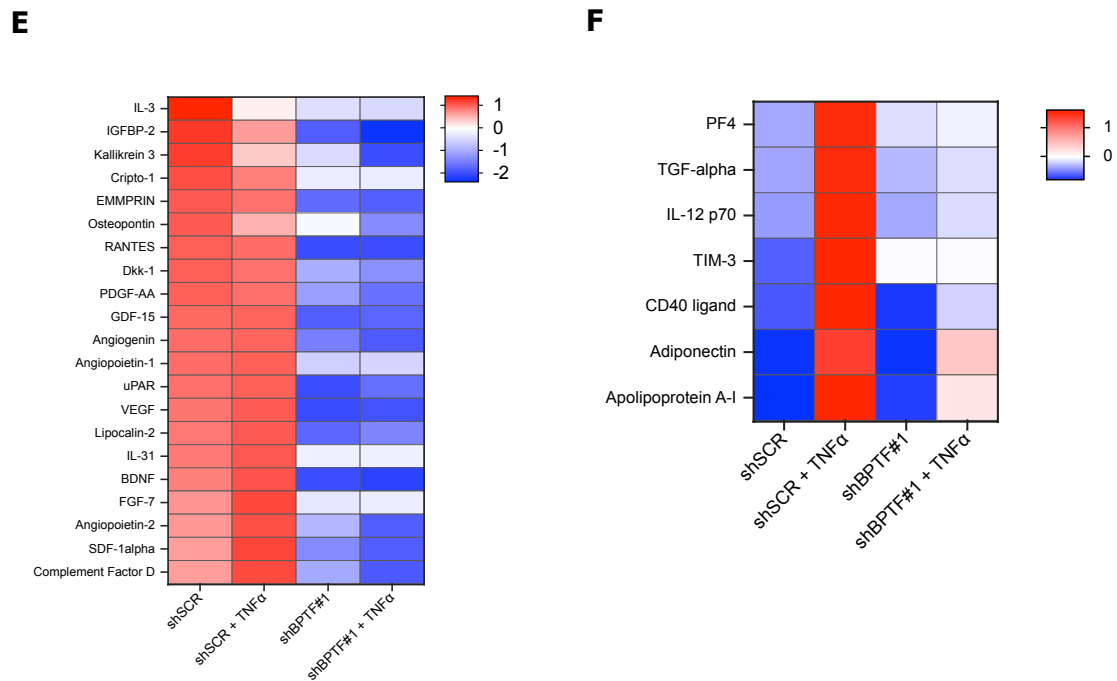


**C**



**D**





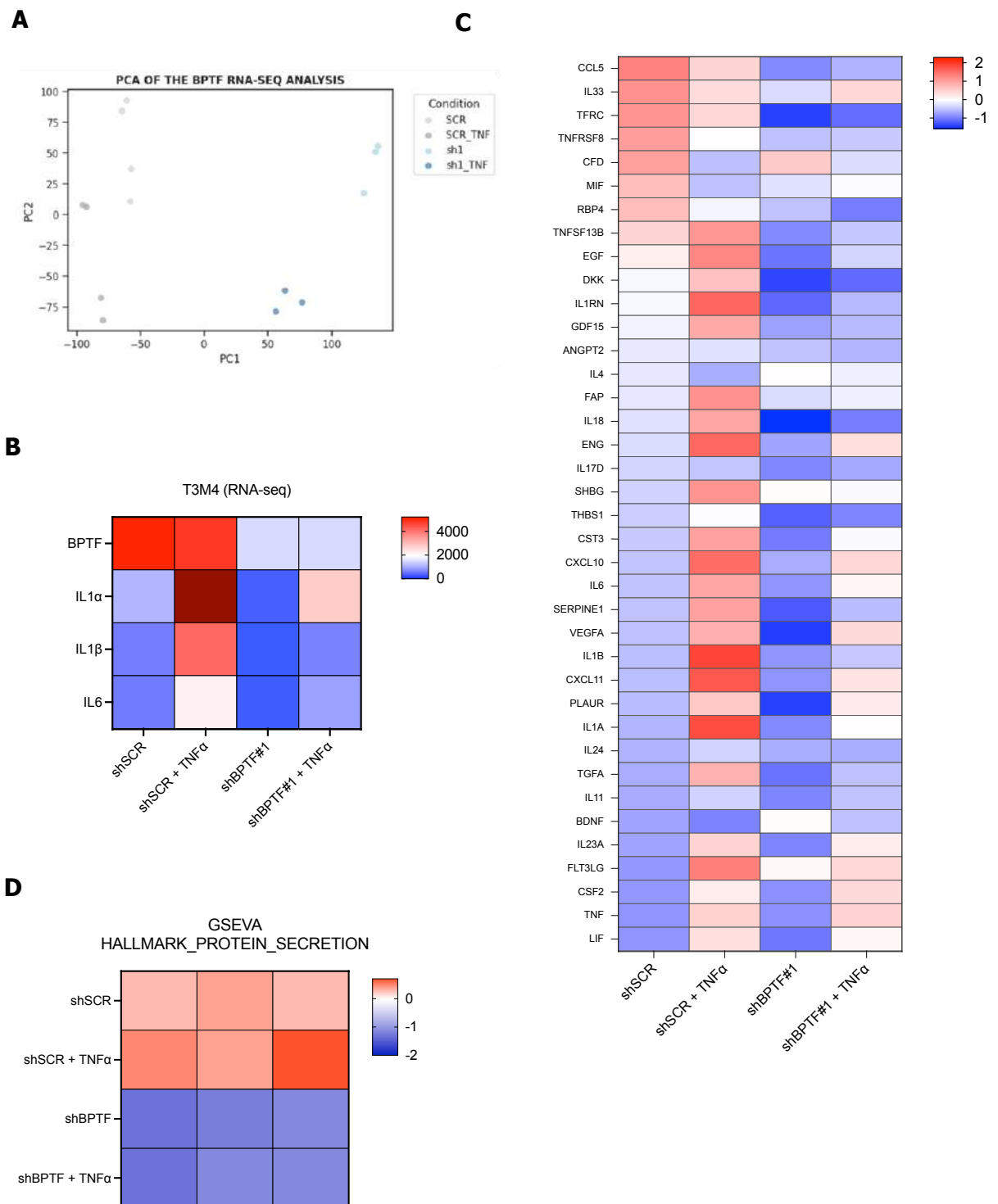
**Figura 29. BPTF es necesario para la regulación de la expresión de las citoquinas inflamatorias tras el tratamiento con TNF $\alpha$ .** (A) Elisa de IL1 $\alpha$ , donde se observa la concentración de esta citoquina en la línea T3M4 tras el tratamiento con TNF $\alpha$  y silenciamiento de *BPTF* con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) por qPCR, (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2 con y sin tratamiento). (B) Membranas representativas de los niveles de expresión de un panel de 105 citoquinas inflamatorias en la línea celular T3M4 tras el silenciamiento con un shRNA (shBPTF#1) respecto a un shRNA control (shSCR) y el tratamiento con TNF $\alpha$ . (C) Diagrama de Venn representativo de los 3 subgrupos generados del array de citoquinas. (D) *Heatmap* representativo de los niveles de expresión de un panel de 74 citoquinas sensibles al tratamiento con TNF $\alpha$  y al silenciamiento de *BPTF* en la línea celular T3M4 (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento). (E) *Heatmap* representativo de los niveles de expresión de un panel de 21 citoquinas no sensibles al tratamiento con TNF $\alpha$ , pero si al silenciamiento de *BPTF* en la línea celular T3M4 (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento). (F) *Heatmap* representativo de los niveles de expresión de un panel de 7 citoquinas sensibles al tratamiento con TNF $\alpha$  pero no al silenciamiento de *BPTF* en la línea celular T3M4 (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

Para respaldar y validar los resultados obtenidos, se realizó un análisis de RNA-seq después del silenciamiento de BPTF mediante shRNA (shBPTF#1), comparado con la secuencia control (shSCR). Tras el procesamiento inicial, se observaron dos valores atípicos en el Análisis de Componentes Principales (PCA), los cuales se excluyeron del análisis para evitar posibles distorsiones en las etapas posteriores, dejando un conjunto de 14 muestras para el estudio (Figura 29A).

## Resultados

Se evaluó el nivel de silenciamiento de BPTF junto con la expresión de las tres citoquinas estudiadas, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, confirmando el comportamiento observado previamente por qPCR (**Figura 29B**). Además, se realizó un análisis más amplio de la firma de citoquinas que aparecían en el array y que mostraban significancia estadística en el RNA-seq, revelando una regulación tanto al alza como a la baja de ellas tras el silenciamiento de BPTF (**Figura 29C**).

Estos resultados no coincidían con los obtenidos en el array, donde se observaba una disminución global de las citoquinas (**Figura 28**). Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis funcional GSEA con firmas moleculares relacionadas con la ruta de secreción de proteínas después del silenciamiento de BPTF y el tratamiento con TNF $\alpha$ . Los resultados demostraron un menor enriquecimiento de los genes asociados a esta ruta tras el silenciamiento de BPTF, lo que dificultaba la secreción de las citoquinas y respaldaba los hallazgos del array de citoquinas (**Figura 29D**).

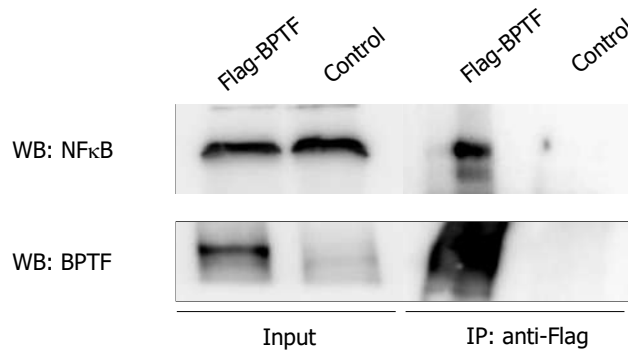


**Figura 29. BPTF regula los niveles de expresión y secreción de las citoquinas inflamatorias tras el tratamiento con TNF $\alpha$ .** (A) PCA de las muestras utilizadas en el RNA-seq (shSCR, shSCR + TNF $\alpha$ , shBPTF#1 y shBPTF#1 + TNF $\alpha$ ) ( $n = 3$ ). (B) Niveles de expresión de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 por RNA-seq en la línea celular T3M4, tras el silenciamiento con un shRNA (shBPTF#1) respecto a un shRNA control (shSCR),

## Resultados

tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento) (C) Heatmap representativo de los niveles de expresión por RNA-seq de un panel citoquinas inflamatorias en la línea celular T3M4, tras el silenciamiento con un shRNA (shBPTF#1) respecto a un shRNA control (shSCR), tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento). (D) GSEVA de firma de genes relacionados con secreción de proteínas, donde se observa un menor enriquecimiento de esta ruta tras el silenciamiento de BPTF ( $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 con y sin tratamiento).

Por último, se quiso corroborar si existía una interacción entre BPTF y  $NF\kappa B$ . Para ello, se transfectó la línea HEK293T con un plásmido que contenía la secuencia Flag-BPTF y se realizó una co-inmunoprecipitación contra Flag; los resultados demostraron como BPTF interacciona con  $NF\kappa B$  de una manera directa (**Figura 30A**).



**Figura 30. BPTF interacciona directamente con  $NF\kappa B$ .** Western Blot de experimento de CO-IP entre  $NF\kappa B$  y BPTF en la línea celular HEK293T, tras la sobre expresión de BPTF unido a una secuencia Flag o con un Flag control.

Basándonos en los resultados obtenidos, se sugiere la existencia de una interacción entre BPTF y  $NF\kappa B$ , así como la influencia del silenciamiento de BPTF en la reducción de la expresión de los genes diana de  $NF\kappa B$ . Este hallazgo implica un papel crucial de BPTF en la regulación de la actividad de  $NF\kappa B$  y sus cascadas de señalización asociadas.

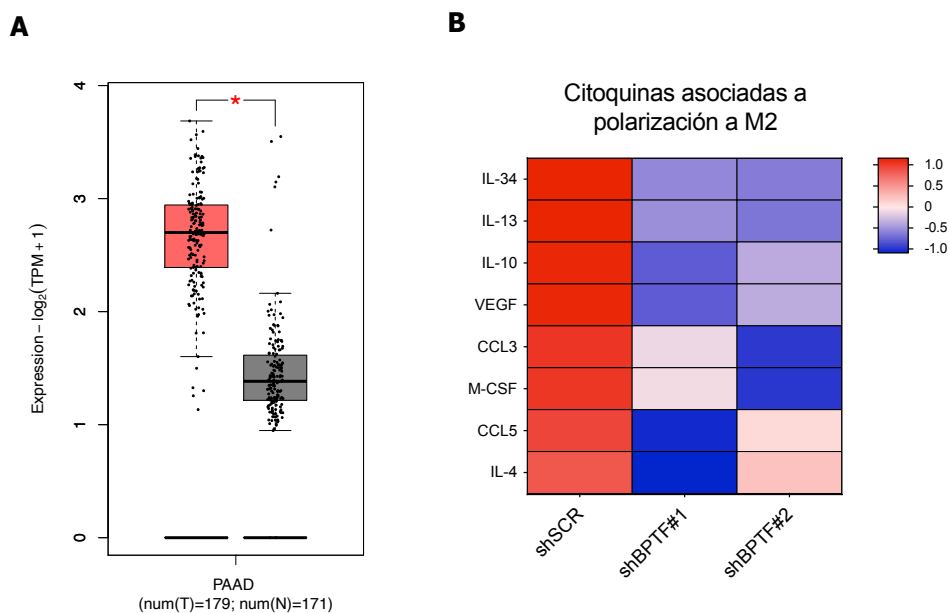
Además, se ha observado cómo la disminución de la expresión de BPTF conlleva la interrupción de las vías necesarias para la secreción de citoquinas, lo que puede afectar la quimioatracción de células del sistema inmunitario pro tumorales. Esta evidencia sugiere un papel multifacético de BPTF en la modulación del microambiente

tumoral, afectando no solo la actividad intrínseca de NFκB, sino también la interacción entre el tumor y el microambiente tumoral.

- **El silenciamiento de *BPTF* condiciona la polarización de macrófagos humanos el fenotipo (M2)**

Para evaluar el impacto de la reducción de las citoquinas reguladas por BPTF en la inmunomodulación del microambiente tumoral, se investigó la polarización de los macrófagos. Se analizó un panel de citoquinas asociadas al reclutamiento y polarización de macrófagos M2, que incluyó IL34, IL13, IL10, VEGF, CCL3, MCSF, CCL5 y IL4. Los resultados revelaron una sobreexpresión significativa de estas citoquinas en pacientes con ADP en comparación con individuos sanos (**Figura 31A**). Posteriormente, se observó una disminución en los niveles de expresión proteica de estas citoquinas después del silenciamiento de BPTF (**Figura 31B**).

Este hallazgo sugiere un papel importante de BPTF en la regulación de las citoquinas asociadas con la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2, caracterizado por propiedades inmunosupresoras y promoción de la progresión tumoral. La reducción de estas citoquinas puede tener implicaciones significativas en la composición y la dinámica del microambiente tumoral, potencialmente alterando la respuesta inmunitaria antitumoral y la progresión del ADP.



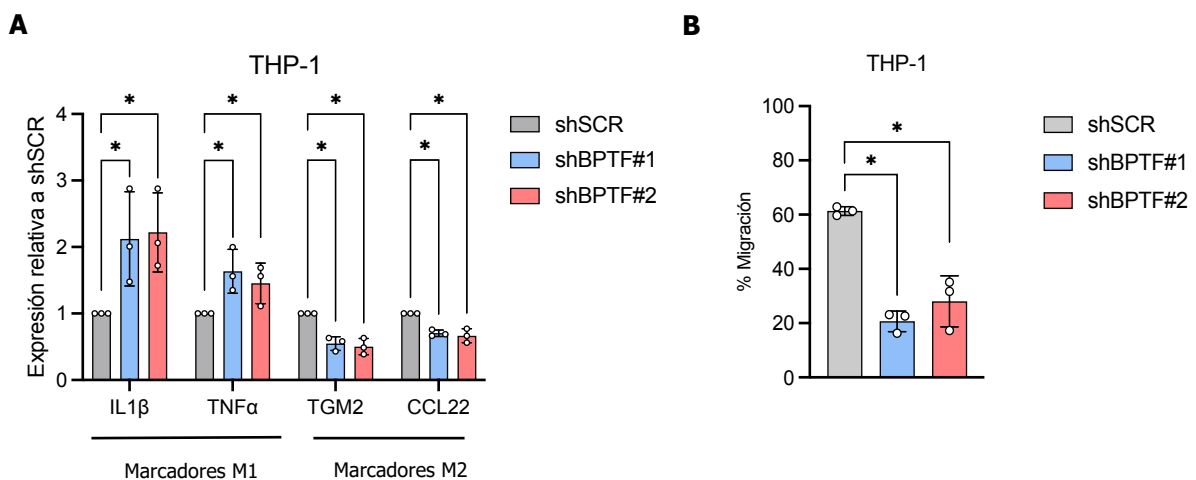
## Resultados

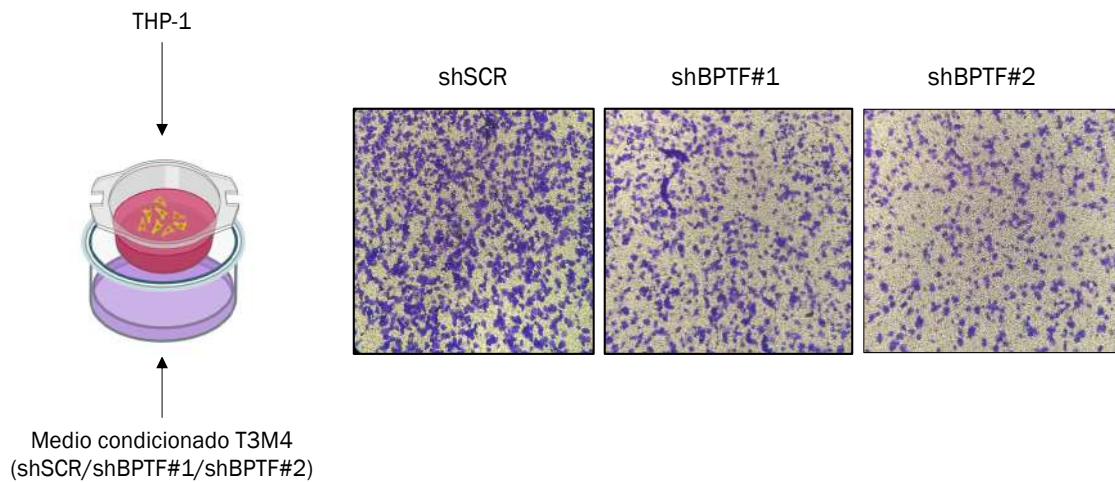
**Figura 31. Citoquinas presentes en el ADP que condicionan la polarización de los macrófagos a M2.** (A) Figura representativa de los niveles de expresión de ocho citoquinas (IL34, IL13, IL10, VEGF, CCL3, MCSF, CCL5 y IL4) en un panel de 179 pacientes con ADP. (B) Heatmap representativo de las ocho citoquinas asociadas a reclutamiento y polarización de macrófagos a M2 tras el silenciamiento de *BPTF* (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2).

Se empleó la línea celular de monocitos inmortalizados THP-1 para investigar su comportamiento *in vitro*. Los monocitos fueron diferenciados a macrófagos utilizando PMA y posteriormente expuestos a medios condicionados de células T3M4 silenciadas para BPTF. Los resultados obtenidos mediante qPCR revelaron una reducción en los niveles de expresión de los marcadores asociados a la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2 (TGM2 y CCL22), mientras que los marcadores de polarización hacia el fenotipo M1 (IL1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) mostraron un aumento significativo (**Figura 32A**).

Además, se evaluó el efecto del medio condicionado de células silenciadas para BPTF en el reclutamiento y migración de las células THP-1 a través de transwell. Los resultados demostraron una disminución en el reclutamiento de las células THP-1 tratadas con el medio condicionado de células silenciadas para BPTF en comparación con el control (**Figura 32**).

Estos hallazgos sugieren un papel fundamental de BPTF en la regulación de la polarización de los macrófagos M0 hacia un fenotipo pro-tumoral M2.



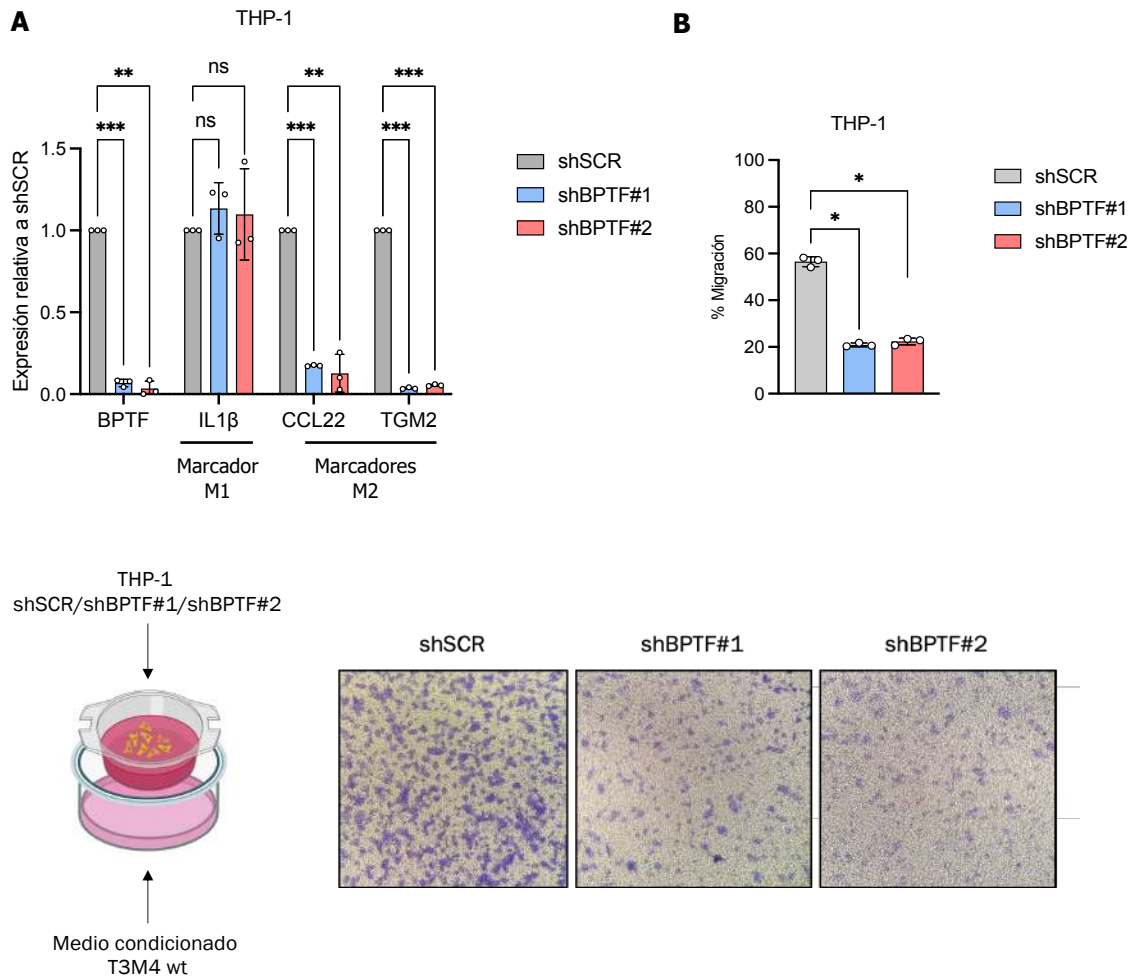


**Figura 32. El silenciamiento de *BPTF* en las células tumorales humanas modula la polarización de THP-1 a M2.** (A) Niveles de expresión por qPCR de los marcadores de M1 ( $IL1\beta$  y  $TNF\alpha$ ) y de M2 ( $TGM2$  y  $CCL22$ ) en THP-1 tratadas con medios condicionados de células T3M4 silenciadas para BPTF con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). (B) Ensayo de migración (Transwell) de las células THP-1 en contacto con medio condicionado de células T3M4 silenciadas para BPTF con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

Siguiendo con la línea de estudio, se procedió a evaluar el impacto del silenciamiento de BPTF en la polarización de los macrófagos. Una vez que se silenció BPTF en las células THP-1, se analizó mediante qPCR la expresión de marcadores asociados al fenotipo M2 luego del tratamiento con medio condicionado de T3M4. Los resultados revelaron que el silenciamiento de BPTF dificulta la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, sin que se observe un cambio significativo en su polarización hacia el fenotipo M1 (**Figura 33A**).

Por otro lado, se investigó la capacidad migratoria de las células THP-1 silenciadas en presencia del medio de T3M4 (**Figura 33B**), lo que evidenció la necesidad de BPTF por parte de las THP-1 para su correcta función migratoria en este contexto. Estos hallazgos subrayan aún más el papel crucial de BPTF en la regulación de la respuesta inmunitaria y la dinámica del microambiente tumoral, particularmente a la polarización de los macrófagos.

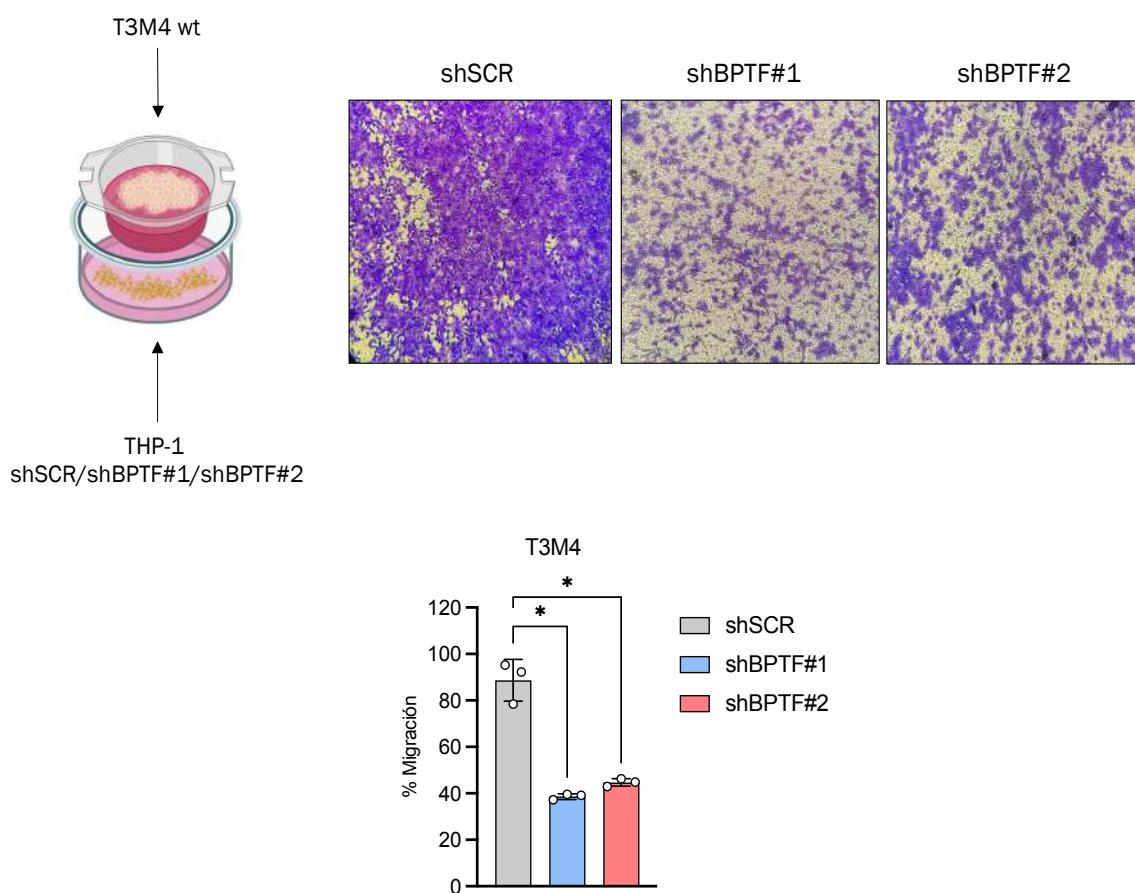
## Resultados



**Figura 33. El silenciamiento de *BPTF* en THP-1 modula su polarización a M2.** (A) Niveles de expresión por qPCR de *BPTF* y de los marcadores de M1 (IL1 $\beta$ ) y de M2 (TGM2 y CCL22) en THP-1 silenciadas para *BPTF* con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). (B) Ensayo de migración (Transwell) de las células THP-1 silenciadas para *BPTF* en contacto con medio de células T3M4 wt (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

Un estudio llevado a cabo por Xiong C et al. demostró cómo los macrófagos M2 pueden modular la capacidad migratoria de las células tumorales mediante la secreción de ciertas citoquinas (C. Xiong et al., 2021). Para validar esta hipótesis, se utilizaron células THP-1 silenciadas para *BPTF* (Figura 34). Los resultados revelaron una notable capacidad migratoria de las células tumorales T3M4 que se encontraban en la cámara

superior del transwell, en contacto con las THP-1 control (shSCR). Se observó que la capacidad migratoria de estas células en contacto con los macrófagos era mayor que cuando estaban solas, lo cual respalda los hallazgos de Xiong C et al. (**Figura 11b**). Sin embargo, se observó una disminución en la migración de las células tumorales en contacto con las THP-1 silenciadas. Estos resultados respaldan la hipótesis inicial de la necesidad de BPTF para la correcta migración, reclutamiento y polarización de los macrófagos, subrayando aún más el papel crucial de BPTF en la dinámica del microambiente tumoral.

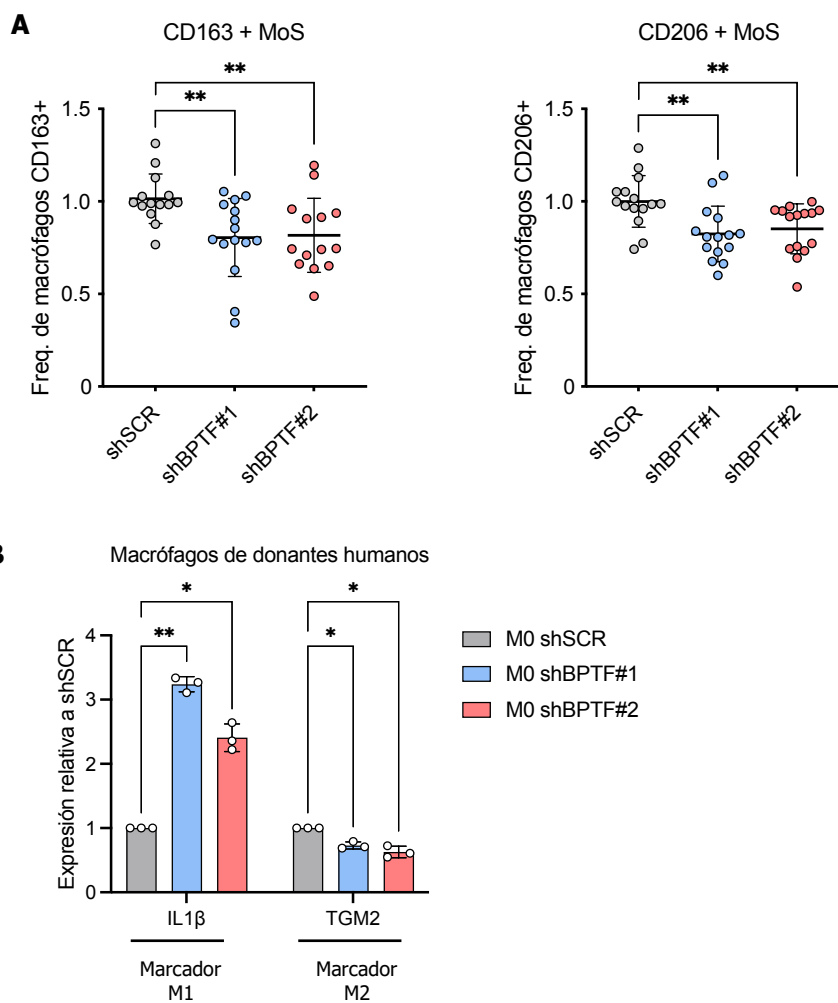


**Figura 34. El silenciamiento de *BPTF* en THP-1 modula la migración de las células tumorales.**

Ensayo de migración (Transwell) de las células T3M4 wt en contacto con células THP-1 silenciadas para BPTF con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

## Resultados

Para obtener una evaluación más precisa de la aplicabilidad clínica de los resultados obtenidos, se derivaron monocitos de 3 pacientes sanos, los cuales se diferenciaron *in vitro* a macrófagos M0 y se pusieron en contacto con medio condicionado de T3M4 con silenciamiento de BPTF. Los resultados revelaron una disminución del porcentaje de macrófagos M2 en aquellos tratados con medio condicionado de células silenciadas para BPTF, tanto por citometría, a través de los marcadores CD206+ y CD163+ (**Figura 35A**), como por qPCR, evidenciando una reducción en TGM2 (**Figura 35B**). Además, se observó un aumento significativo de los niveles de IL1 $\beta$ , marcador de M1, por qPCR (**Figura 35B**). Estos hallazgos sugieren un potencial impacto clínico al revelar cómo la manipulación de BPTF puede modular la polarización de los macrófagos, lo que podría tener implicaciones terapéuticas significativas en el tratamiento de la enfermedad.



**Figura 35. El silenciamiento de *BPTF* en las células tumorales humanas modula la polarización de macrófagos de donantes a M2.** (A) Figura representativa de la polarización de macrófagos de tres donantes sanos a M2 por citometría tras el tratamiento de estos a medios condicionados de células T3M4 silenciadas para BPTF con dos shRNA (shBPTF#1 y shBPTF#2) respecto a un shRNA control (shSCR) (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). (B) Niveles de expresión por qPCR del marcador de M1 (IL1 $\beta$ ) y el de M2 (TGM2) en los macrófagos de tres donantes sanos tratados con los medios condicionados de células silenciadas para BPTF (Media  $\pm$  SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

Estos resultados subrayan la necesidad de BPTF para la adecuada polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro tumoral (M2), al tiempo que sugieren un posible incremento en los niveles de macrófagos anti-tumorales M1. Este hallazgo se observó tanto en macrófagos inmortalizados como en macrófagos derivados de pacientes, lo que refuerza su relevancia clínica y su potencial como objetivo terapéutico en el tratamiento de enfermedades tumorales.



## **Conclusiones**

---



Después de analizar el efecto del silenciamiento de BPTF en un panel de líneas de ADP, se derivan varias conclusiones de relevancia científica:

- **BPTF es esencial para la actividad proliferativa en ADP:** La inhibición de BPTF ralentiza significativamente la capacidad proliferativa de las células, induciendo una detención del ciclo celular tanto *in vitro* como *in vivo*.
- **BPTF es un factor crucial para la migración en ADP:** el silenciamiento de BPTF reduce la migración de las células de ADP, lo que sugiere su papel en la regulación de la movilidad celular.
- **El silenciamiento de BPTF sensibiliza a las células de ADP a la gemcitabina:** La disminución de la expresión de BPTF aumenta la sensibilidad de las células de ADP a la gemcitabina tanto *in vitro* como *in vivo*, indicando su potencial como diana terapéutica.
- **BPTF regula la expresión de los genes diana de BRCA2:** El silenciamiento de BPTF redujo la expresión de los genes diana de BRCA2, llevando consigo un aumento del daño al ADN.
- **La inhibición de BPTF aumenta el efecto sinérgico del tratamiento con gemcitabina y olaparib:** Combinar la inhibición de BPTF con el tratamiento de gemcitabina y olaparib aumenta el daño al ADN, sugiriendo una estrategia terapéutica potencialmente eficaz.
- **BPTF modula la expresión de citoquinas en el microambiente tumoral:** La reducción de BPTF en las células de ADP disminuye la expresión y secreción de citoquinas inflamatorias, lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmune y la progresión tumoral.
- **BPTF co-inmunoprecipita con NFκB:** Se observa una interacción entre BPTF y NFκB, lo que se correlaciona con una regulación negativa de la expresión de los citoquinas diana de NFκB.
- **BPTF es esencial para la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2:** El silenciamiento de BPTF reduce la polarización y el reclutamiento de macrófagos M2, mientras que en los macrófagos M0, BPTF es necesario para su polarización hacia M2, sugiriendo un papel fundamental en la modulación del microambiente tumoral.



## **Discusión**

---



En este trabajo se ha estudiado el papel de BPTF como posible diana terapéutica en el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP), explorando su participación en los procesos de quimiorresistencia e inmunomodulación del microambiente tumoral.

BPTF es un remodelador de la cromatina perteneciente a la familia NURF, encargada de reconocer las marcas epigenéticas H3K4me3 y H4K16ac, y de promover el desplazamiento de nucleosomas, necesario para la actividad transcripcional del factor de transcripción c-MYC (Barak, 2003; Richart, Carrillo-De Santa Pau, et al., 2016). Estudios anteriores del grupo demostraron como BPTF era necesario para la actividad de c-MYC, mediante la remodelación de la cromatina y su reclutamiento a los sitios de unión de baja afinidad (Richart, Carrillo-De Santa Pau, et al., 2016). Este mismo estudio demostró el potencial terapéutico de BPTF en un modelo de ratón de ADP dirigido por el oncogén c-MYC (Ela1-Myc), donde la ablación genética de BPTF, redujo drásticamente el desarrollo tumoral (Richart, Carrillo-De Santa Pau, et al., 2016). Sin embargo, la principal limitación de este estudio fue el uso de un modelo cáncer de páncreas donde la mutación iniciadora era el oncogén c-MYC, en lugar de KRAS, mutada en el 90% de este tipo de tumores (Richart, Carrillo-De Santa Pau, et al., 2016). Para validar el potencial terapéutico del BPTF en modelos celulares humanos y murinos dirigidos por mutaciones en KRAS, se utilizó un panel de líneas celulares de ADP, junto a un modelo de ratón singénico derivado del modelo (LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+; Pdx1-Cre (KPC-CHX)) (Hingorani et al., 2005; Olive & Tuveson, 2006). En estos modelos, el desarrollo de tumores es dirigido por las alteraciones en Kras<sup>G12D</sup> y p53<sup>R172H</sup>, asemejándose de una manera más estricta al ADP clínico. (Hingorani et al., 2005). El silenciamiento de BPTF, mediante CRISPRi o shRNA, tanto *in vitro* como *in vivo*, redujo drásticamente la proliferación tumoral, respaldando los resultados obtenidos en el modelo de ratón Ela1-Myc (Richart, Carrillo-De Santa Pau, et al., 2016). La disminución observada en la progresión tumoral se atribuyó principalmente a una detención del ciclo celular en la fase G1, con una reducción significativa de células en la fase S. Además, se observó que el silenciamiento de BPTF reducía la expresión de genes asociados a la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y a metástasis, lo cual se reflejó en los ensayos de Transwell y herida, donde se evidenció una disminución significativa de este fenómeno en las células deficientes en BPTF.

## Discusión

Estos resultados demuestran cómo BPTF es necesario para la tumorigénesis, por ello, se quiso estudiar de igual manera su posible implicación en la sinergia con gemcitabina, principal fármaco utilizado en clínica para el tratamiento del ADP. Uno de los principales mecanismos descritos sobre la quimiorresistencia asociada de la gemcitabina, se basa en la sobre expresión de los transportadores de membrana ABC (Kang et al., 2009). El factor de transcripción c-MYC, en entre otros, es uno de los principales encargados de la expresión de los genes relacionados con las bombas transportadoras, sin embargo, este no es único, ya que, en otros tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, se pudo relacionar la expresión de los transportadores con otros factores de transcripción como NF $\kappa$ B (Kang et al., 2009; Velaei et al., 2017). Los resultados obtenidos demostraron cómo el silenciamiento de BPTF impedía el reclutamiento de c-MYC a sus distintos sitios de unión en el promotor del gen de los transportadores (ABCC1), afectando así a su transcripción, de igual manera, los resultados obtenidos que demostraban la unión de BPTF con NF $\kappa$ B, avalan los resultados *Valei et al.*, donde la regulación de los transportadores ABC, también está mediada por este factor de transcripción. Estos datos se tradujeron en un incremento en la retención intracelular de gemcitabina, lo que resultó en una prolongación del efecto de la droga en el ADN, aumentando así el daño. Este hallazgo respalda los datos obtenidos por *Zhao et al.*, quienes demostraron cómo el verapamilo, inhibidor específico de los transportadores ABC, aumentaba la acumulación intracelular de gemcitabina y sensibilizaba a las células resistentes a esta droga (Zhao et al., 2016). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que BPTF desempeña un papel crucial en las células tumorales del adenocarcinoma de páncreas (ADP) al regular las rutas implicadas en la resistencia a fármacos, especialmente a la gemcitabina.

Los resultados obtenidos abrían una nueva posibilidad de terapia para el ADP, combinando la inhibición de BPTF con el tratamiento con gemcitabina. Estudios iniciales, como el presentado por *Gong F et al.*, demostraron cómo BPTF parecía ser necesario para la reparación del daño, al ser reclutado a zona afectada tras incidir con un haz de luz a células humanas (Gong et al., 2015). Para corroborar dicha hipótesis, se inhibió la expresión de BPTF, observándose un incremento del daño al ADN. El resultado obtenido era concordante con otros estudios donde la inhibición de remodeladores de cromatina, como es el caso de SNF2L, generaba un aumento en el daño al ADN, activación de proteínas de reparación y un incremento de la compactación de la cromatina, dificultando así el acceso de la maquinaria de reparación, y, por tanto, generando parada de ciclo y

disminución la tasa de crecimiento tumoral (Smeenk et al., 2010; Ye et al., 2009). Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento significativo en el daño al ADN en células con deficiencia de BPTF, y como efecto se intensificó con el tiempo, sugiriendo una posible disrupción en alguna de las vías de reparación del ADN mediadas por BPTF. Este hallazgo fue respaldado mediante análisis de GSEA, los cuales revelaron un aumento en la expresión de genes asociados al daño del ADN y al control del ciclo celular, específicamente en la transición de la fase G1 a la fase S. Estos datos refuerzan la idea de que el silenciamiento de BPTF induce un daño que afecta negativamente la capacidad proliferativa de las células tumorales.

El incremento del daño en las células con inhibición de BPTF sugería la posibilidad de explorar el uso de inhibidores de las vías de reparación para potenciar el efecto sinérgico con la gemcitabina. En el contexto de la reparación del ADN, se identifican diversas vías encargadas de abordar los daños en la estructura del ADN. Destacan la vía de reparación de roturas de doble cadena, asociada a BRCA2, y la vía de reparación de roturas simples de cadena, asociada a PARP. La inhibición de PARP ha sido investigada como una estrategia terapéutica en ciertos tipos de cáncer, aprovechando la sinergia con deficiencias en la vía de BRCA2, lo que conduce a la acumulación de daño y, en última instancia, a la muerte celular. (Miller et al., 2019; Roy et al., 2012). *Quiñonero et al.*, demostraron cómo el uso de inhibidores de PARP, de forma concomitante con gemcitabina aumentaba el daño y el efecto terapéutico en células de ADP (Quiñonero et al., 2022). Este hallazgo, complementado por los resultados obtenidos mediante el análisis GSEA, donde se observó una disminución en los genes diana de BRCA2, respalda la hipótesis de utilizar inhibidores de PARP junto con gemcitabina en células deficientes en BPTF. Así, dado el mecanismo de acción de la gemcitabina, que incrementa la acumulación de roturas de ADN de cadena simple, la inhibición de la vía de PARP acentuaría estos daños simples, convirtiéndolos en roturas de doble cadena mediadas por BRCA2. Esta sinergia se intensificaría en células con deficiencia en BPTF, ya que como se ha demostrado, existe una disminución de genes asociados a BRCA2, lo que amplificaría el daño al ADN. (Fedor et al., 2013). Se decidió investigar esta hipótesis combinando la inhibición de BPTF con la administración de gemcitabina de forma individual o conjunta con olaparib. Los resultados obtenidos revelaron que la inhibición de BPTF en presencia de gemcitabina u olaparib incrementaba significativamente el daño al ADN, siendo este efecto aún más pronunciado cuando se administraban en combinación. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de desarrollar nuevas terapias

## Discusión

combinadas, donde la administración conjunta de gemcitabina y olaparib en pacientes con mutaciones truncantes en BPTF identificados mediante cribado, podría potenciar de manera sinérgica el efecto del tratamiento, ofreciendo nuevas perspectivas en el manejo terapéutico del ADP, especialmente en aquellos con alteraciones genéticas específicas.

Como se ha podido observar, una de las características fundamentales del adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) es su marcada quimiorresistencia, que se atribuye principalmente al difícil acceso de los agentes quimioterapéuticos a las células tumorales. Esta dificultad surge como consecuencia de la marcada reacción desmoplásica y la escasa vascularización del tumor. (Feig et al., 2012;); es por esta razón que la búsqueda de tratamientos capaces de modular el microambiente tumoral se vuelve esencial. Esto permitiría reducir la dificultad de acceso de los agentes quimioterapéuticos a las células tumorales, lo que a su vez mejoraría la eficacia del tratamiento con quimioterapia y facilitar la aplicación de la inmunoterapia. Varios estudios han descrito cómo c-MYC media la transcripción de citoquinas asociadas al reclutamiento y polarización de poblaciones inmunes. (Sodir et al., 2011, 2019). Por lo tanto, se quiso evaluar si la inhibición de BPTF producía cambios en el comportamiento del microambiente tumoral, facilitando una respuesta más efectiva a la inmunoterapia. Los resultados revelaron una disminución generalizada en los niveles de expresión de la mayoría de las citoquinas después del silenciamiento de BPTF. Un análisis detallado de los factores de transcripción responsables de la expresión de estas citoquinas respaldaba la implicación de la vía de NF $\kappa$ B como la principal responsable de su regulación. Varios estudios han descrito la activación constitutiva de la vía de NF $\kappa$ B en pacientes con ADP, y la implicación directa en el proceso de tumorigénesis y metástasis tumoral. (Fujioka, Sclabas, Schmidt, Frederick, et al., 2003; Fujioka, Sclabas, Schmidt, Niu, et al., 2003). Dentro de las citoquinas clave en los procesos inflamatorios en el ADP nos encontramos con IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. (Melisi et al., 2009). IL1 $\alpha$ , una vez secretada, activa NF $\kappa$ B mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Esto resulta en un aumento de la expresión de citoquinas pro-metastáticas como IL8 y VEGF. (Tjomsland et al., 2011). Además de lo mencionado, un estudio realizado en un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático ha evidenciado cómo la sobreexpresión de IL1 $\alpha$  por parte de las células tumorales conduce a un incremento significativo en los niveles de expresión HGF por parte de los CAFs. Esta molécula se encuentra directamente implicada en los procesos de proliferación y metástasis de las células tumorales pancreáticas (D. Xu et al., 2010). Por parte de IL1 $\beta$ , una vez secretada, se modula el reclutamiento y polarización de

poblaciones del sistema inmune pro-tumorales mediante la activación de NF $\kappa$ B (Carmi et al., 2013). Además de esto, en un modelo transgénico de carcinogénesis dependiente de Myc, se ha identificado a IL1 $\beta$  como la principal molécula efectora en el inicio de la angiogénesis. A través de la activación de las células endoteliales, la secreción de IL1 $\beta$  por parte de las células tumorales induce la producción de VEGF y otros factores pro-angiogénicos, modulando el microambiente inflamatorio. Esta modulación facilita la angiogénesis y promueve la progresión tumoral. (Baker et al., 2019). Por último, IL6, citoquina regulada tanto NF $\kappa$ B como por STAT3, es pieza crucial en proliferación celular y mantenimiento del microambiente tumoral del ADP (Brasier, 2010). El aumento de los niveles de expresión de IL6 se ha correlacionado positivamente con una mayor agresividad tumoral, así como con la aparición de pérdida de peso, caquexia y la capacidad metastática (Ebrahimi et al., 2004). En base a estos hallazgos, se tomó la decisión de investigar si BPTF desempeñaba un papel crucial en la regulación de la expresión de estas citoquinas. Por consiguiente, se planteó la hipótesis de que la inhibición de la expresión de BPTF podría resultar en una disminución en la expresión de estas citoquinas, lo que potencialmente alteraría el microambiente tumoral y por tanto disminuiría la tumorigénesis asociada a la expresión de estas citoquinas. Los resultados evidenciaron una disminución generalizada en la expresión de estas citoquinas luego de silenciar la expresión de BPTF indicando una posible implicación de BPTF de manera directa o indirecta en la regulación de la expresión de citoquinas por parte de las células tumorales.

Con base en estos resultados, que indicaban una regulación positiva de la expresión de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 por parte de BPTF, se llevó a cabo un estudio más amplio sobre un panel de citoquinas para investigar si también se encontraban reguladas por BPTF. Los resultados revelaron que, de manera similar a lo observado con IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, otras citoquinas mostraban una regulación a la baja después del silenciamiento de BPTF. Con el fin de examinar si la regulación de la expresión de estas citoquinas reguladas por BPTF estaba relacionada con una de las principales vías de modulación de la actividad inflamatoria, como es la vía del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), se decidió estimular las células con TNF $\alpha$ , un activador directo de la vía NF $\kappa$ B, y analizar su activación de manera dependiente de BPTF. Los resultados obtenidos revelan una interacción entre BPTF y NF- $\kappa$ B, siendo BPTF necesario para la expresión de sus genes diana, como es el caso de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren al eje NF $\kappa$ B-BPTF como una posible diana terapéutica. Hasta el momento, los estudios clínicos

## Discusión

con inhibidores de NF $\kappa$ B han tendido mayormente a dirigirse a moléculas implicadas en la cascada de activación de NF $\kappa$ B, como es el caso de I $\kappa$ B. (Fujioka, Sclabas, Schmidt, Niu, et al., 2003), sin embargo, estos no han llegado a tener unos efectos importantes, debido en gran medida a la toxicidad asociada (Märten et al., 2008). Por tanto, los resultados muestran como BPTF es necesario para la expresión de los genes diana de la vía de NF- $\kappa$ B, estos hallazgos combinados con los de Richart et al., donde la inhibición sistémica de BPTF en modelos *in vivo* de ADP no provocaban toxicidad asociada (Richart, Real, et al., 2016), sugieren el potencial uso de inhibidores de BPTF para regular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B y, por ende, el microambiente tumoral asociado al adenocarcinoma ductal pancreático (ADP). Este enfoque podría representar una posible nueva diana terapéutica contra el ADP.

Dentro del conjunto de citoquinas a estudio, se observó que varias de ellas estaban estrechamente relacionadas con procesos de reclutamiento y polarización de macrófagos hacia un fenotipo pro-tumoral (M2). Además, se pudo constatar cómo estas citoquinas eran moduladas de manera significativa tras el silenciamiento de BPTF, entre ellas se encuentran IL34, IL10, MCSF, CCL5 y IL4 (Aldinucci & Colombatti, 2014; Coley, 2017). Los macrófagos M2 representan una de las principales subpoblaciones celulares vinculadas a la progresión tumoral. Se sabe que desempeñan un papel crucial en la promoción de la proliferación tumoral, facilitando la metástasis y contribuyendo al desarrollo de resistencia a la quimioterapia, incluida la gemcitabina. (B. Liu et al., 2016; Velasco et al., 2022). Los resultados obtenidos revelaron que la inhibición de BPTF y, por ende, la disminución de las citoquinas pro-M2 producidas por las células tumorales, se correlacionaba con una reducción en el reclutamiento y la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2.

Las interacciones heterotípicas entre los distintos tipos celulares en el microambiente tumoral operan en ambas direcciones. Un estudio reciente demostró que la inhibición de la proteína Syk, secretada por los macrófagos y conocida por estimular la proliferación del adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), reprogramó a los macrófagos hacia un fenotipo inmunoestimulador. Esto condujo a un aumento en la infiltración, proliferación y citotoxicidad de las células T CD8+, al tiempo que suprimió el crecimiento y la metástasis del PDAC (Rohila et al., 2023). Por ello, se optó por investigar directamente el papel de BPTF en los macrófagos y examinar cómo su silenciamiento afectaba a su polarización en contacto con células tumorales. Este enfoque permite

simular de manera más precisa un posible tratamiento sobre el tumor, donde un inhibidor de BPTF actuaría de manera sistémica sobre todas las poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral. Los resultados indicaron que BPTF es esencial para la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2, mientras que no se observaron cambios significativos en su polarización hacia un fenotipo M1. Investigaciones previas realizadas por *Xiong et al.* demostraron cómo los macrófagos M2 desempeñan un papel crucial en los procesos de migración y metástasis, al atraer a las células tumorales y promover su proliferación. (C. Xiong et al., 2021). Con base en estos resultados, se tomó la decisión de investigar si la incapacidad de polarización hacia macrófagos M2 después del silenciamiento de BPTF por parte de los macrófagos, resultaba en una disminución de la capacidad metastásica de las células tumorales. Se observó que el silenciamiento de BPTF en los macrófagos, redujo su capacidad quimioatrayente sobre las células tumorales, lo que subraya la importancia de mantener un fenotipo pro-tumoral para la promoción de la metástasis y abaló la utilización de inhibidores de BPTF para el tratamiento del ADP.

Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar inhibidores de BPTF que actúen sobre el conjunto de células pro-tumorales presentes en el microambiente tumoral, incluyendo los macrófagos M2. Esta estrategia podría facilitar la infiltración de células citotóxicas efectoras, como los linfocitos T CD8+, y enriquecer las vías moleculares implicadas en la activación del sistema inmunitario, lo que podría mejorar la respuesta inmunitaria contra el tumor y potencialmente limitar su progresión y metástasis. (Ollauri-Ibáñez et al., 2021). En un contexto inmunocompetente, la implementación de nuevas alternativas terapéuticas basadas en inmunoterapia en combinación con la inhibición de BPTF podría ser una estrategia prometedora. Al potenciar la respuesta inmunitaria y reducir la capacidad de las células tumorales para manipular el microambiente tumoral en su beneficio, esta combinación terapéutica podría aumentar la eficacia del sistema inmunológico para combatir el cáncer. Además, al dirigirse tanto a las células tumorales como a las células pro-tumorales del microambiente, esta estrategia podría tener un impacto más amplio en la progresión del cáncer y en la reducción de la resistencia a la terapia. (Ollauri-Ibáñez et al., 2021). Por tanto, el desarrollo de terapias para el adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) donde el silenciamiento de BPTF sea un componente clave del tratamiento se vuelve una necesidad urgente. La presencia de dominios específicos en BPTF sugiere la posibilidad de diseñar inhibidores más efectivos, los cuales podrían avanzar hacia la aplicación clínica en protocolos de quimioterapia

## Discusión

neoadyuvante, ya sea de manera individual o en combinación con otros agentes, como los inhibidores de PARP. Resultados prometedores en cáncer de pulmón, presentados por *Xu et al.*, respaldan esta idea, destacando el diseño de un inhibidor específico de BPTF, C620-0696, dirigido al bromodominio (J. Xu et al., 2020). Por otro lado, *Lu et al.* diseñaron dos nuevos inhibidores de BPTF, DC-BPi-07 y DC-BPi-11, con potencial terapéutico en leucemias (L. Xiong et al., 2021). Por consiguiente, el desarrollo y la evaluación de estos nuevos inhibidores, además de la búsqueda de nuevos, podrían ser un paso significativo en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del adenocarcinoma ductal pancreático, lo que facilitaría su potencial utilización en futuros ensayos clínicos. Estos inhibidores podrían ser investigados tanto de manera individual como en combinación con gemcitabina, gemcitabina y olaparib, o con inmunoterapia, ofreciendo así opciones terapéuticas más efectivas y personalizadas para los pacientes con ADP.

## **Bibliografía**

---



- 2024-cancer-facts-and-figures-acs. (2024)
- Abbas, A. R., Wolslegel, K., Seshasayee, D., Modrusan, Z., & Clark, H. F. (2009). Deconvolution of blood microarray data identifies cellular activation patterns in systemic lupus erythematosus. *PloS One*, *4*(7), e6098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006098>
- Aldinucci, D., & Colombatti, A. (2014). The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators of Inflammation*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/292376>
- Apte, R. N., Krelin, Y., Song, X., Dotan, S., Recih, E., Elkabets, M., Carmi, Y., Dvorkin, T., White, R. M., Gayvoronsky, L., Segal, S., & Voronov, E. (2006). Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour–host interactions. *European Journal of Cancer*, *42*(6), 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.010>
- Aronow, R. A., Akbarinejad, S., Le, T., Su, S., & Shahriyari, L. (2022). TumorDecon: A digital cytometry software. *SoftwareX*, *18*, 101072. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2022.101072>
- Baker, K. J., Houston, A., & Brint, E. (2019). IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01197>
- Balkwill, F. R., & Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.005>
- Barak, O. (2003). Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *The EMBO Journal*, *22*(22), 6089–6100. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg582>
- Block, K. M., Hanke, N. T., Maine, E. A., & Baker, A. F. (2012). IL-6 Stimulates STAT3 and Pim-1 Kinase in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*, *41*(5), 773–781. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31823cdd10>
- Brasier, A. R. (2010). The nuclear factor- $\kappa$ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovascular Research*, *86*(2), 211–218. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq076>
- Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M. R., Baron, R., Abutbul, S., Huszar, M., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Voronov, E. (2013). The Role of IL-1 $\beta$  in the Early Tumor Cell–Induced Angiogenic Response. *The Journal of Immunology*, *190*(7), 3500–3509. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202769>

## Bibliografía

- Casanova-Acebes, M., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Porcuna, J., Álvarez-Erriico, D., Lavin, Y., García, A., Kobayashi, S., Le Berichel, J., Núñez, V., Were, F., Jiménez-Carretero, D., Sánchez-Cabo, F., Merad, M., & Ricote, M. (2020). RXRs control serous macrophage neonatal expansion and identity and contribute to ovarian cancer progression. *Nature Communications*, *11*(1), 1655. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15371-0>
- Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O’Kane, G. M., Connor, A. A., Denroche, R. E., Grant, R. C., McLeod, J., Wilson, J. M., Jang, G. H., Zhang, A., Dodd, A., Liang, S.-B., Borgida, A., Chadwick, D., Kalimuthu, S., Lungu, I., ... Notta, F. (2020). Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nature Genetics*, *52*(2), 231–240. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>
- Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., & Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>
- Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., & Wei, X. (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>
- Coley, W. (2017). *Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy*. *9*, 347–360.
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. (2019). Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *16*(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., ... Bachet, J.-B. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, *379*(25), 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the <sc>IL</sc> -1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, *281*(1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatics*, *51*(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>

- Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., & Zhang, L. (2020). Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer*, *6*(7), 605–618. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.022>
- Ebrahimi, B., Tucker, S. L., Li, D., Abbruzzese, J. L., & Kurzrock, R. (2004). Cytokines in pancreatic carcinoma. *Cancer*, *101*(12), 2727–2736. <https://doi.org/10.1002/cncr.20672>
- Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C. A., Hu, B., Jin, C., & Flavell, R. A. (2013). Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Reviews Cancer*, *13*(11), 759–771. <https://doi.org/10.1038/nrc3611>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fang, W. Bin, Acevedo, D. S., Smart, C., Zinda, B., Alissa, N., Warren, K., Fraga, G., Huang, L. C., Shyr, Y., Li, W., Xie, L., & Staggs, V. (2021). Expression of CCL2 / CCR2 signaling proteins in breast carcinoma cells is associated with invasive progression. *Scientific Reports*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88229-0>
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M.-L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., & Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cellular Microbiology*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/cmi.12028>
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The Pancreas Cancer Microenvironment. *Clinical Cancer Research*, *18*(16), 4266–4276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3114>
- Foroutan, M., Bhuva, D. D., Lyu, R., Horan, K., Cursons, J., & Davis, M. J. (2018). Single sample scoring of molecular phenotypes. *BMC Bioinformatics*, *19*(1), 404. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2435-4>
- Fujioka, S., Sclabas, G. M., Schmidt, C., Frederick, W. A., Dong, Q. G., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Baker, C., & Chiao, P. J. (2003). Function of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer metastasis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *9*(1), 346–354.
- Fujioka, S., Sclabas, G. M., Schmidt, C., Niu, J., Frederick, W. A., Dong, Q. G., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Baker, C., & Chiao, P. J. (2003). Inhibition of

## Bibliografía

- constitutive NF- $\kappa$ B activity by I $\kappa$ B $\alpha$ M suppresses tumorigenesis. *Oncogene*, *22*(9), 1365–1370. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206323>
- Garcia, P. L., Miller, A. L., Kreitzburg, K. M., Council, L. N., Gamblin, T. L., Christein, J. D., Heslin, M. J., Arnoletti, J. P., Richardson, J. H., Chen, D., Hanna, C. A., Cramer, S. L., Yang, E. S., Qi, J., Bradner, J. E., & Yoon, K. J. (2016). The BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in patient-derived xenograft models. *Oncogene*, *35*(7), 833–845. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.126>
- Gong, F., Chiu, L.-Y., Cox, B., Aymard, F., Clouaire, T., Leung, J. W., Cammarata, M., Perez, M., Agarwal, P., Brodbelt, J. S., Legube, G., & Miller, K. M. (2015). Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes & Development*, *29*(2), 197–211. <https://doi.org/10.1101/gad.252189.114>
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell*, *15*(2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
- Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P., & Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, *11*(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>
- Guo, B., Fu, S., Zhang, J., Liu, B., & Li, Z. (2016). Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Scientific Reports*, *6*(1), 36107. <https://doi.org/10.1038/srep36107>
- Hasan, N., & Ahuja, N. (2019). The Emerging Roles of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Complexes in Pancreatic Cancer. *Cancers*, *11*(12), 1859. <https://doi.org/10.3390/cancers11121859>
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, *7*(5), 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>

- Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *International Immunology*, *33*(3), 127–148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>
- Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., & Chen, S.-H. (2006). Gr-1 + CD115 + Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Research*, *66*(2), 1123–1131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., & Hiraoka, N. (2013). Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, *108*(4), 914–923. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.32>
- Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S., & Mills, K. H. G. (2006). Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- $\beta$ -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *177*(2), 896–904. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.896>
- Ji, Z., He, L., Regev, A., & Struhl, K. (2019). Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- $\kappa$ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(19), 9453–9462. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821068116>
- Johnson, D. E., O’Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(4), 234–248. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>
- Jones, M. H., Hamana, N., & Shimane, M. (2000). Identification and Characterization of BPTF, a Novel Bromodomain Transcription Factor. *Genomics*, *63*(1), 35–39. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.6070>
- Kang, K. W., Im, Y. Bin, Go, W. J., & Han, H. K. (2009). C-Myc amplification altered the gene expression of ABC-and SLC-transporters in human breast epithelial cells. *Molecular Pharmaceutics*, *6*(2), 627–633. <https://doi.org/10.1021/mp800116f>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*(April), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>

## Bibliografía

- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, *15*(12), 731–744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Lianyuan, T., Gang, L., Ming, T., Dianrong, X., Chunhui, Y., Zhaolai, M., & Bin, J. (2020). Tumor associated neutrophils promote the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, *21*(10), 937–945. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1807250>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lin, H.-J., Liu, Y., Caroland, K., & Lin, J. (2023). Polarization of Cancer-Associated Macrophages Maneuver Neoplastic Attributes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, *15*(13), 3507. <https://doi.org/10.3390/cancers15133507>
- Liu, B., Jia, Y., Ma, J., Wu, S., Jiang, H., Cao, Y., Sun, X., Yin, X., Yan, S., Shang, M., & Mao, A. (2016). Tumor-associated macrophage-derived CCL20 enhances the growth and metastasis of pancreatic cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *48*(12), 1067–1074. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw101>
- Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W. E., Zinn, K. R., & Zhang, H.-G. (2007). Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, *109*(10), 4336–4342. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-046201>
- Luo, G., Fan, Z., Gong, Y., Jin, K., Yang, C., Cheng, H., Huang, D., Ni, Q., Liu, C., & Yu, X. (2019). Characteristics and Outcomes of Pancreatic Cancer by Histological Subtypes. *Pancreas*, *48*(6), 817–822. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001338>
- Märten, A., Zeiss, N., Serba, S., Mehrle, S., von Lilienfeld-Toal, M., & Schmidt, J. (2008). Bortezomib is ineffective in an orthotopic mouse model of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(11), 3624–3631. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0393>
- Melisi, D., Niu, J., Chang, Z., Xia, Q., Peng, B., Ishiyama, S., Evans, D. B., & Chiao, P. J. (2009). Secreted Interleukin-1 $\alpha$  Induces a Metastatic Phenotype in Pancreatic Cancer by Sustaining a Constitutive Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Molecular Cancer Research*, *7*(5), 624–633. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0201>
- Miller, A. L., Fehling, S. C., Garcia, P. L., Gamblin, T. L., Council, L. N., van Waardenburg, R. C. A. M., Yang, E. S., Bradner, J. E., & Yoon, K. J. (2019). The BET inhibitor JQ1

- attenuates double-strand break repair and sensitizes models of pancreatic ductal adenocarcinoma to PARP inhibitors. *EBioMedicine*, *44*, 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.035>
- Miller, A. L., Garcia, P. L., Fehling, S. C., Gamblin, T. L., Vance, R. B., Council, L. N., Chen, D., Yang, E. S., van Waardenburg, R. C. A. M., & Yoon, K. J. (2021). The BET Inhibitor JQ1 Augments the Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Preclinical Models of Pancreatic Cancer. *Cancers*, *13*(14), 3470. <https://doi.org/10.3390/cancers13143470>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Notta, F., Chan-Seng-Yue, M., Lemire, M., Li, Y., Wilson, G. W., Connor, A. A., Denroche, R. E., Liang, S.-B., Brown, A. M. K., Kim, J. C., Wang, T., Simpson, J. T., Beck, T., Borgida, A., Buchner, N., Chadwick, D., Hafezi-Bakhtiari, S., Dick, J. E., Heisler, L., ... Gallinger, S. (2016). A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*, *538*(7625), 378–382. <https://doi.org/10.1038/nature19823>
- Nozawa, H., Chiu, C., & Hanahan, D. (2006). *Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. 2006.*
- Ogawa, R., Yamamoto, T., Hirai, H., & Hanada, K. (2019). *Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via CXCL1 / 8-CXCR2 axis.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3684>
- O'Hara, M. H., O'Reilly, E. M., Varadhachary, G., Wolff, R. A., Wainberg, Z. A., Ko, A. H., Fisher, G., Rahma, O., Lyman, J. P., Cabanski, C. R., Mick, R., Gherardini, P. F., Kitch, L. J., Xu, J., Samuel, T., Karakunnel, J., Fairchild, J., Bucktrout, S., LaVallee, T. M., ... Vonderheide, R. H. (2021). CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *The Lancet Oncology*, *22*(1), 118–131. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30532-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30532-5)

## Bibliografía

- Olive, K. P., & Tuveson, D. A. (2006). The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research*, *12*(18), 5277–5287. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0436>
- Ollauri-Ibáñez, C., Ayuso-Íñigo, B., & Pericacho, M. (2021). Hot and Cold Tumors: Is Endoglin (CD105) a Potential Target for Vessel Normalization? *Cancers*, *13*(7), 1552. <https://doi.org/10.3390/cancers13071552>
- O'Reilly, E. M., Oh, D.-Y., Dhani, N., Renouf, D. J., Lee, M. A., Sun, W., Fisher, G., Hezel, A., Chang, S.-C., Vlahovic, G., Takahashi, O., Yang, Y., Fitts, D., & Philip, P. A. (2019). Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncology*, *5*(10), 1431. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1588>
- Orekhov, A. N., Orekhova, V. A., Nikiforov, N. G., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., Romanenko, E. B., Zhang, D., & Chistiakov, D. A. (2019). Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, *2019*. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2019.04>
- Ouyang, X., Liu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Wei, T.-T., Liu, C., Lee, B., Chen, B., Zhang, A., Casey, K. M., Wang, L., Kooreman, N. G., Habtezion, A., Engleman, E. G., & Wu, J. C. (2021). Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer. *Stem Cell Reports*, *16*(6), 1468–1477. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.004>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Müller, A., Nothman, J., Louppe, G., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2012). *Scikit-learn: Machine Learning in Python*.
- Pereira, B. A., Vennin, C., Papanicolaou, M., Chambers, C. R., Herrmann, D., Morton, J. P., Cox, T. R., & Timpson, P. (2019). CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer. *Trends in Cancer*, *5*(11), 724–741. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.09.010>
- Peters, M. L. B., Eckel, A., Mueller, P. P., Tramontano, A. C., Weaver, D. T., Lietz, A., Hur, C., Kong, C. Y., & Pandharipande, P. V. (2018). Progression to pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatic intraepithelial neoplasia: Results of a simulation model. *Pancreatology*, *18*(8), 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.07.009>
- Poh, A. R., & Ernst, M. (2018). Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Frontiers in Oncology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00049>

- Porcelli, L., Iacobazzi, R. M., Di Fonte, R., Serrati, S., Intini, A., Solimando, A. G., Brunetti, O., Calabrese, A., Leonetti, F., Azzariti, A., & Silvestris, N. (2019). CAFs and TGF- $\beta$  signaling activation by mast cells contribute to resistance to Gemcitabine/Nabpaclitaxel in Pancreatic Cancer. *Cancers*, *11*(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers11030330>
- Qin, F., Liu, X., Chen, J., Huang, S., Wei, W., Zou, Y., & Liu, X. (2020). *Anti-TGF- $\beta$  attenuates tumor growth via polarization of tumor associated neutrophils towards an anti-tumor phenotype in colorectal cancer.* *11*. <https://doi.org/10.7150/jca.38179>
- Quiñonero, F., Mesas, C., Muñoz-Gámez, J. A., Jiménez-Luna, C., Perazzoli, G., Prados, J., Melguizo, C., & Ortiz, R. (2022). PARP1 inhibition by Olaparib reduces the lethality of pancreatic cancer cells and increases their sensitivity to Gemcitabine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *155*, 113669. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113669>
- Rašková, M., Lacina, L., Kejík, Z., Venhauerová, A., Skaličková, M., Kolář, M., Jakubek, M., Rosel, D., Smetana, K., & Brábek, J. (2022). The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis—Overview and Therapeutic Opportunities. *Cells*, *11*(22), 3698. <https://doi.org/10.3390/cells11223698>
- Reese, F., Williams, B., Balderrama-Gutierrez, G., Wyman, D., Çelik, M. H., Rebboah, E., Rezaie, N., Trout, D., Razavi-Mohseni, M., Jiang, Y., Borsari, B., Morabito, S., Liang, H. Y., McGill, C. J., Rahmanian, S., Sakr, J., Jiang, S., Zeng, W., Carvalho, K., ... Mortazavi, A. (2023). The ENCODE4 long-read RNA-seq collection reveals distinct classes of transcript structure diversity. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.15.540865>
- Riccio, A., Aaltonen, L. A., Godwin, A. K., Loukola, A., Percesepe, A., Salovaara, R., Masciullo, V., Genuardi, M., Paravatou-Petsotas, M., Bassi, D. E., Ruggeri, B. A., Klein-Szanto, A. J. P., Testa, J. R., Neri, G., & Bellacosa, A. (1999). The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nature Genetics*, *23*(3), 266–268. <https://doi.org/10.1038/15443>
- Richart, L., Carrillo-De Santa Pau, E., Río-Machín, A., De Andrés, M. P., Cigudosa, J. C., Lobo, V. J. S. A., & Real, F. X. (2016). BPTF is required for c-MYC transcriptional activity and in vivo tumorigenesis. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10153>

## Bibliografía

- Richart, L., Real, F. X., & Sanchez-Arevalo Lobo, V. J. (2016). c-MYC partners with BPTF in human cancer. *Molecular and Cellular Oncology*, 3(3). <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1152346>
- Rohila, D., Park, I. H., Pham, T. V., Weitz, J., Hurtado de Mendoza, T., Madheswaran, S., Ishfaq, M., Beaman, C., Tapia, E., Sun, S., Patel, J., Tamayo, P., Lowy, A. M., & Joshi, S. (2023). Syk Inhibition Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Overcomes Gemcitabine-Induced Immunosuppression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 83(16), 2675–2689. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-3645>
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). 2 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
- Rubie, C., Frick, V. O., Ghadjar, P., Wagner, M., Grimm, H., Vicinus, B., Justinger, C., Graeber, S., & Schilling, M. K. (2010). CCL20/CCR6 expression profile in pancreatic cancer. *Journal of Translational Medicine*, 8(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-45>
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., & Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *The Journal of Immunology*, 179(2), 977–983. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.977>
- Smeenk, G., Wiegant, W. W., Vrolijk, H., Solari, A. P., Pastink, A., & van Attikum, H. (2010). The NuRD chromatin–remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *Journal of Cell Biology*, 190(5), 741–749. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001048>
- Sodir, N. M., Kortlever, R. M., Barthet, V. J. A., & Pellegrinet, L. (2019). *Myc instructs and maintains pancreatic adenocarcinoma phenotype*.
- Sodir, N. M., Swigart, L. B., Karnezis, A. N., Hanahan, D., Evan, G. I., & Soucek, L. (2011). Endogenous Myc maintains the tumor microenvironment. *Genes and Development*, 25(9), 907–916. <https://doi.org/10.1101/gad.2038411>

- Stouten, I., van Montfoort, N., & Hawinkels, L. J. A. C. (2023). The Tango between Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) and Immune Cells in Affecting Immunotherapy Efficacy in Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(10), 8707. <https://doi.org/10.3390/ijms24108707>
- Timmer, F. E. F., Geboers, B., Nieuwenhuizen, S., Dijkstra, M., Schouten, E. A. C., Puijk, R. S., de Vries, J. J. J., van den Tol, M. P., Bruynzeel, A. M. E., Streppel, M. M., Wilmink, J. W., van der Vliet, H. J., Meijerink, M. R., Scheffer, H. J., & de Gruijl, T. D. (2021). Pancreatic Cancer and Immunotherapy: A Clinical Overview. *Cancers*, *13*(16), 4138. <https://doi.org/10.3390/cancers13164138>
- Tjomsland, V., Spångeus, A., Väilä, J., Sandström, P., Borch, K., Druid, H., Falkmer, S., Falkmer, U., Messmer, D., & Larsson, M. (2011). Interleukin 1 $\alpha$  Sustains the Expression of Inflammatory Factors in Human Pancreatic Cancer Microenvironment by Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *Neoplasia*, *13*(8), 664-IN3. <https://doi.org/10.1593/neo.11332>
- Vaish, U., Jain, T., Are, A. C., & Dudeja, V. (2021). Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Update on Heterogeneity and Therapeutic Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13408. <https://doi.org/10.3390/ijms222413408>
- Velaei, K., Samadi, N., Soltani, S., Barazvan, B., & Soleimani Rad, J. (2017). NF $\kappa$ Bp65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer. *Breast Cancer*, *24*(4), 552–561. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0738-8>
- Velasco, R. M., García, A. G., Sánchez, P. J., Sellart, I. M., & Sánchez-Arévalo Lobo, V. J. (2022). Tumour microenvironment and heterotypic interactions in pancreatic cancer. *Journal of Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00875-8>
- Vera, R., Dotor, E., Feliu, J., González, E., Laquente, B., Macarulla, T., Martínez, E., Maurel, J., Salgado, M., & Manzano, J. L. (2016). SEOM Clinical Guideline for the treatment of pancreatic cancer (2016). *Clinical and Translational Oncology*, *18*(12), 1172–1178. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1586-x>
- Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2645–2650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437939100>

## Bibliografía

- Wang, X., Lang, M., Zhao, T., Feng, X., Zheng, C., Huang, C., Hao, J., Dong, J., Luo, L., Li, X., Lan, C., Yu, W., Yu, M., Yang, S., & Ren, H. (2017). Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3+Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, *36*(21), 3048–3058. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.458>
- Weichand, B., Popp, R., Dziumbila, S., Mora, J., Strack, E., Elwakeel, E., Frank, A.-C., Scholich, K., Pierre, S., Syed, S. N., Olesch, C., Ringleb, J., Ören, B., Döring, C., Savai, R., Jung, M., von Knethen, A., Levkau, B., Fleming, I., ... Brüne, B. (2017). S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 $\beta$ . *Journal of Experimental Medicine*, *214*(9), 2695–2713. <https://doi.org/10.1084/jem.20160392>
- Weiss, G. J., Blaydorn, L., Beck, J., Bornemann-Kolatzki, K., Urnovitz, H., Schütz, E., & Khemka, V. (2018). Phase Ib/II study of gemcitabine, nab-paclitaxel, and pembrolizumab in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Investigational New Drugs*, *36*(1), 96–102. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0525-1>
- Wong, S. J., Gearhart, M. D., Taylor, A. B., Nanyes, D. R., Ha, D. J., Robinson, A. K., Artigas, J. A., Lee, O. J., Demeler, B., Hart, P. J., Bardwell, V. J., & Kim, C. A. (2016). KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure*, *24*(10), 1795–1801. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.07.011>
- Xiao, Z., Li, J., Yu, Q., Zhou, T., Duan, J., Yang, Z., Liu, C., & Xu, F. (2021). An Inflammatory Response Related Gene Signature Associated with Survival Outcome and Gemcitabine Response in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.778294>
- Xie, F., Huang, M., Lin, X., Liu, C., Liu, Z., Meng, F., Wang, C., & Huang, Q. (2018). The BET inhibitor I-BET762 inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation and enhances the therapeutic effect of gemcitabine. *Scientific Reports*, *8*(1), 8102. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26496-0>
- Xiong, C., Zhu, Y., Xue, M., Jiang, Y., Zhong, Y., Jiang, L., Shi, M., & Chen, H. (2021). Tumor-associated macrophages promote pancreatic ductal adenocarcinoma progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Aging*, *13*(3), 3386–3404. <https://doi.org/10.18632/aging.202264>
- Xiong, L., Mao, X., Guo, Y., Zhou, Y., Chen, M., Chen, P., Yang, S., & Li, L. (2021). Discovery of selective BPTF bromodomain inhibitors by screening and structure-based optimization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *545*, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.067>

- Xu, D., Matsuo, Y., Ma, J., Koide, S., Ochi, N., Yasuda, A., Funahashi, H., Okada, Y., & Takeyama, H. (2010). Cancer cell-derived IL-1 $\alpha$  promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Oncology*, *102*(5), 469–477. <https://doi.org/10.1002/jso.21530>
- Xu, J., Wang, Q., Leung, E. L. H., Li, Y., Fan, X., Wu, Q., Yao, X., & Liu, L. (2020). Compound C620-0696, a new potent inhibitor targeting BPTF, the chromatin-remodeling factor in non-small-cell lung cancer. *Frontiers of Medicine*, *14*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0694-8>
- Yang, S., Liu, Q., & Liao, Q. (2021). Tumor-Associated Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Origin, Polarization, Function, and Reprogramming. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.607209>
- Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Wang, Q., Yearsley, K., Wani, A. A., Yan, Q., Gao, J.-X., Shetuni, B. S., & Barsky, S. H. (2009). Inhibition of Expression of the Chromatin Remodeling Gene, *SNF2L*, Selectively Leads to DNA Damage, Growth Inhibition, and Cancer Cell Death. *Molecular Cancer Research*, *7*(12), 1984–1999. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0119>
- Zhan, H., Zhou, B., Cheng, Y., Xu, J., Wang, L., Zhang, G., & Hu, S. (2017). Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Letters*, *392*, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.01.041>
- Zhang, Y., Lazarus, J., Steele, N. G., Yan, W., Lee, H.-J., Nwosu, Z. C., Halbrook, C. J., Menjivar, R. E., Kemp, S. B., Sirihorachai, V. R., Velez-Delgado, A., Donahue, K., Carpenter, E. S., Brown, K. L., Irizarry-Negron, V., Nevison, A. C., Vinta, A., Anderson, M. A., Crawford, H. C., ... Pasca di Magliano, M. (2020). Regulatory T-cell Depletion Alters the Tumor Microenvironment and Accelerates Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Discovery*, *10*(3), 422–439. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0958>
- ZHAO, L., ZHAO, Y., SCHWARZ, B., MYSLIWIETZ, J., HARTIG, R., CAMAJ, P., BAO, Q., JAUCH, K.-W., GUBA, M., ELLWART, J. W., NELSON, P. J., & BRUNS, C. J. (2016). Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapy-resistant pancreatic cancer side population cells. *International Journal of Oncology*, *49*(1), 99–110. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3512>
- Zhou, S.-L., Dai, Z., Zhou, Z.-J., Wang, X.-Y., Yang, G.-H., Wang, Z., Huang, X.-W., Fan, J., & Zhou, J. (2012). Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and

## Bibliografía

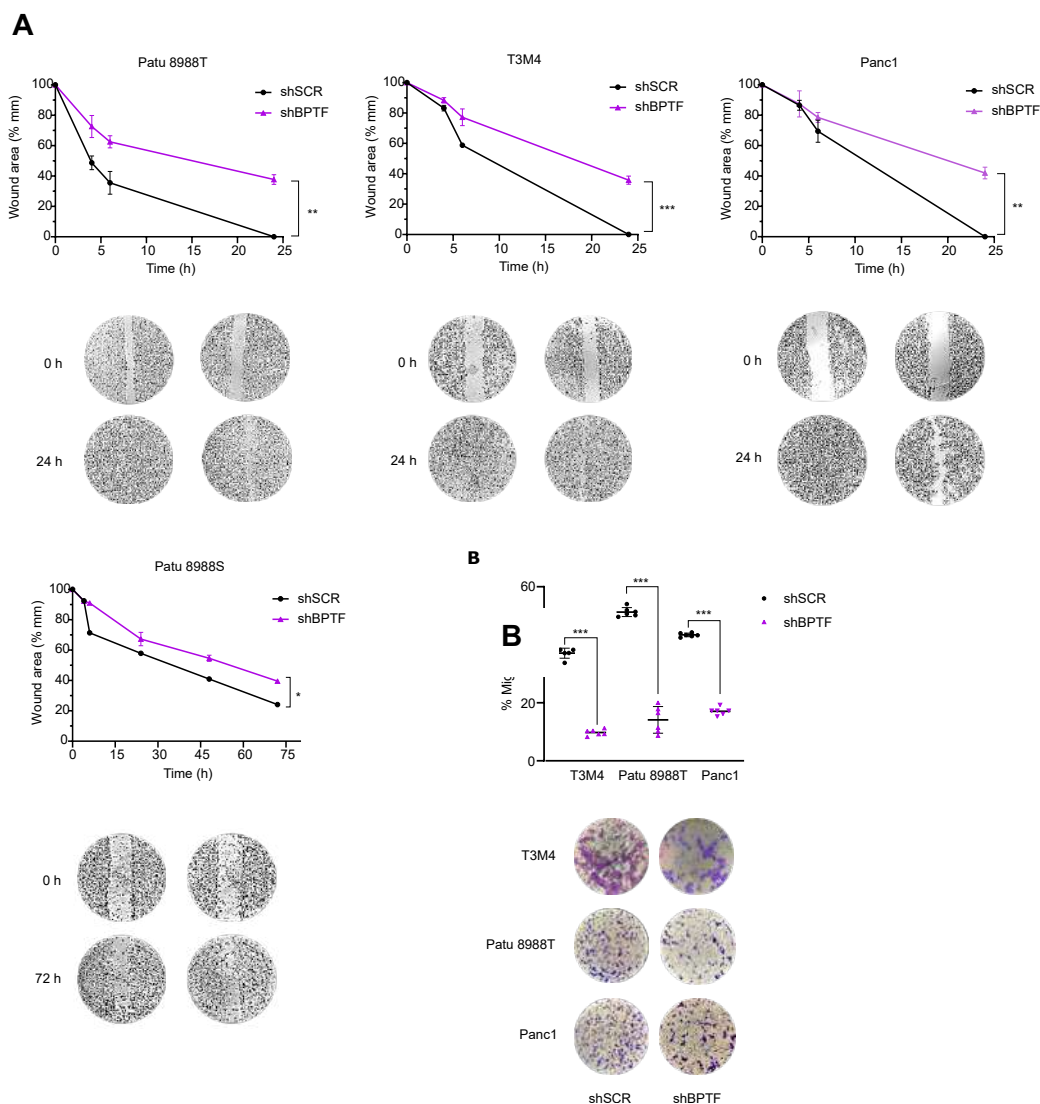
indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 56(6), 2242–2254. <https://doi.org/10.1002/hep.25907>

## **Anexos**

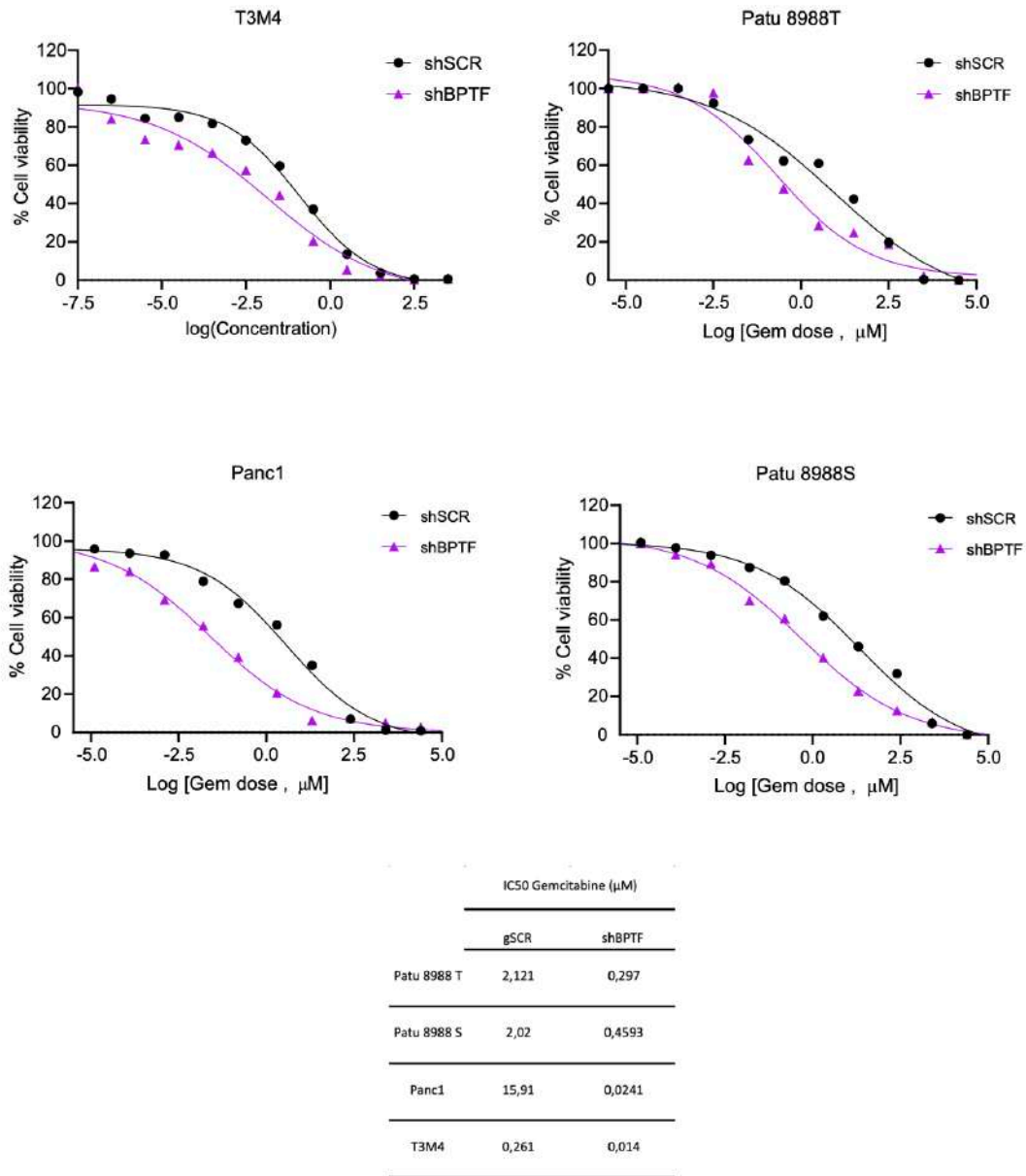
---



• **Figura Suplementaria 1**



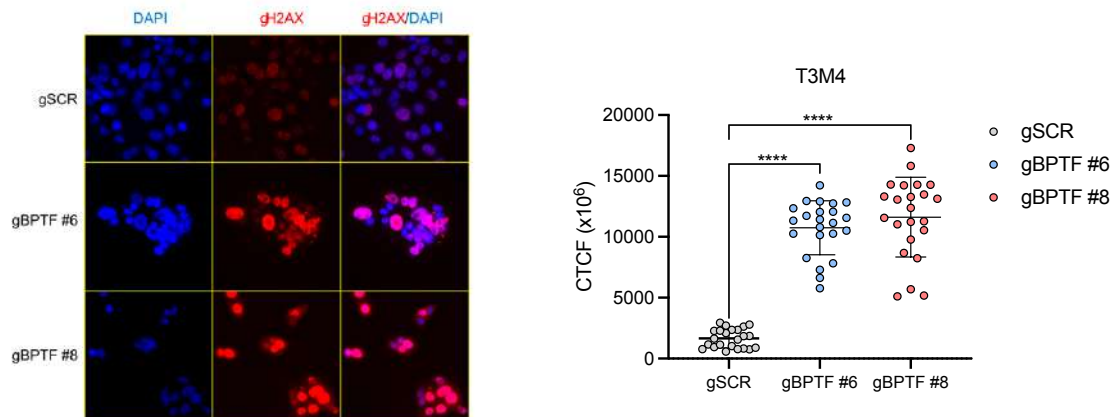
• **Figura Suplementaria 2**



**Figura Suplementaria 2. El silenciamiento de *BPTF* sensibiliza al ADP a la gemcitabina *in vitro*.**

Ensayo de IC50 a distintas concentraciones de gemcitabina tras el silenciamiento de *BPTF* con un shBPTF en comparación con la secuencia control (gSCR) en las cuatro líneas de estudio (Media ± SEM,  $n = 3$ , shSCR vs shBPTF #1). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

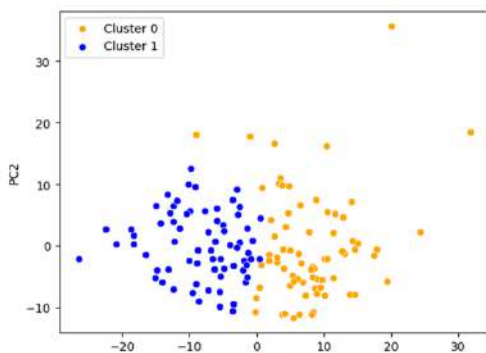
• **Figura Suplementaria 3**



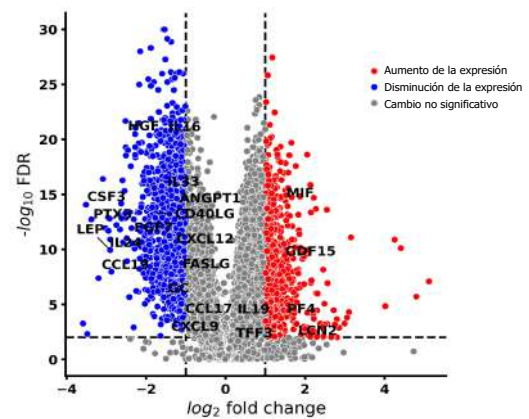
**Figura Suplementaria 3. BPTF es necesario para el proceso de reparación del DNA.** Estudio de la positividad para gH2AX por inmunofluorescencia tras el tratamiento con gemcitabina (0,5 mM) durante 24 horas en las líneas con BPTF silenciado (gBPTF#6 y gBPTF#8) en comparación con el control (gSCR) (Media  $\pm$  SEM, n = 3, gSCR vs gBPTF #6 y gBPTF #8). Un valor de p valor inferior al 0.05 se ha considerado como estadísticamente significativo (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005).

• **Figura Suplementaria 4**

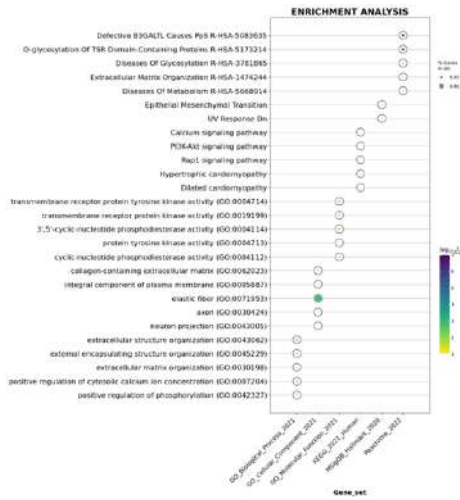
**A**



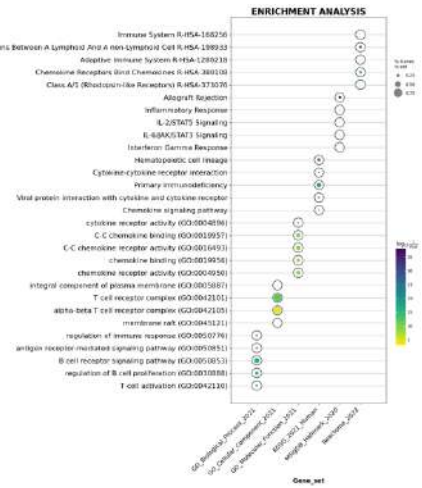
**B**



C

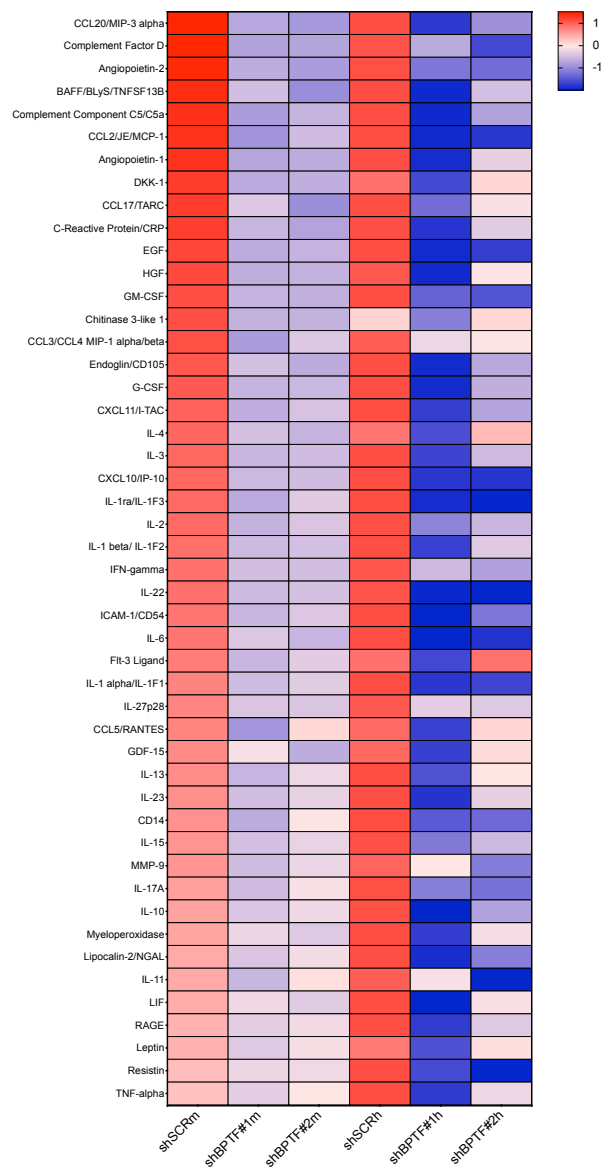


D



**Figura Suplementaria 3. Perfiles de enriquecimiento de los clúster 0 y 1. (A)** PCA del clúster 1 o 0 **(B)** Perfil de enriquecimiento del módulo Darkgrey. **(C)** Perfil de enriquecimiento del módulo Brown.

- Figura Suplementaria 5



**Figura Suplementaria 5. El silenciamiento de *BPTF* modula la expresión de las citoquinas tanto en el modelo murino como humano de ADP.** Heatmap representativo de las citoquinas comunes tanto en el array murino (shSCRm, shBPTF#1m, shBPTF#2m) como en el humano (shSCRh, shBPTF#1h, shBPTF#2h) tras el silenciamiento de *BPTF* (Media  $\pm$  SEM, shSCR vs shBPTF #1 y shBPTF #2, tanto humano como murino).

• **Tabla suplementaria 1**

| <b>BPTF Humano gRNAs para CRISPRi VJ603</b> |                           |       |
|---|---------------------------|-------|
| <b>humano gRNA1</b>                         | CACCGCCCCCGATGGGTCCGGACG  | VP59  |
| CCCCCGATGGGTCCGGACG TGG                     | aaacCGTCCGGACCCATCGGGGGGC | VP60  |
| <b>humano gRNA2</b>                         | CACCGccACGTCCGGACCCATCGGG | VP61  |
| ccACGTCCGGACCCATCGGG GGG                    | aaacCCGATGGGTCCGGACGTggC  | VP62  |
| <b>humano gRNA3</b>                         | CACCGcccccACGTCCGGACCCAT  | VP63  |
| ccgcccACGTCCGGACCCAT CGG                    | aaacATGGGTCCGGACGTggggcgC | VP64  |
| <b>humano gRNA4</b>                         | CACCGCCATCGGGGGGCTCCGCTCG | VP65  |
| CCATCGGGGGCTCCGCTCG CGG                     | aaacCGAGCGGAGCCCCCGATGGC  | VP66  |
| <b>humano gRNA5</b>                         | CACCGcccACGTCCGGACCCATCGG | VP67  |
| cccACGTCCGGACCCATCGG GGG                    | aaacCCGATGGGTCCGGACGTggC  | VP68  |
| <b>humano gRNA6</b>                         | CACCGTCCGACATGAGGGGCCGG   | VP79  |
| GCTCCGACATGAGGGGCCGG CGG                    | aaacCCGGCCCCATGTCCGGAC    | VP80  |
| <b>humano gRNA7</b>                         | CACCGGGGAGCCGGGGCTGCTT    | VP81  |
| GCGGGAGCCGGGGCTGCTT GGG                     | aaacAAGCAGCCCGGGCTCCCGC   | VP82  |
| <b>humano gRNA8</b>                         | CACCGCCCCAGTACCAGCGGAGA   | VP107 |
| CCCCCAGTACCAGCGGAGA GGG                     | aaacTCCTGCTGGTGTGCTGGGGC  | VP108 |
| <b>humano gRNA9</b>                         | CACCGTCCACCCGCTCCGTCGGC   | VP109 |
| TCCACCCGCTCCGTCGGC CGG                      | aaacGCCGACGGAAGCGGTGGAGC  | VP110 |

| <b>BPTF Murino gRNAs para CRISPRi VJ603</b> |                           |      |
|---|---------------------------|------|
| <b>murino gRNA1</b>                         | CACCGCCCCCGATGGGTCCGGACG  | VP59 |
| GCATGTCCGGACCCGGCTTG CGG                    | aaacCGTCCGGACCCATCGGGGGGC | VP60 |
| <b>murino gRNA2</b>                         | CACCGccACGTCCGGACCCATCGGG | VP61 |
| GCCCGCTCCGGACCCATAG GGG                     | aaacCCGATGGGTCCGGACGTggC  | VP62 |
| <b>murino gRNA3</b>                         | CACCGcccccACGTCCGGACCCAT  | VP63 |
| GCGGAGCCGAGCCCCCTAT GGG                     | aaacATGGGTCCGGACGTggggcgC | VP64 |
| <b>murino gRNA4</b>                         | CACCGCCATCGGGGGGCTCCGCTCG | VP65 |
| GTCCGACATGAGGGGCCGGCG GGG                   | aaacCGAGCGGAGCCCCCGATGGC  | VP66 |
| <b>murino gRNA5</b>                         | CACCGcccACGTCCGGACCCATCGG | VP67 |
| GCAGCCCCCTATGGGTCCGG AGG                    | aaacCCGATGGGTCCGGACGTggC  | VP68 |
| <b>murino gRNA6</b>                         | CACCGTCCGACATGAGGGGCCGG   | VP79 |
| GGGCGCCACCTCAGCTGGG CGG                     | aaacCCGGCCCCATGTCCGGAC    | VP80 |

| <b>BPTF shRNA humano</b> |                       |      |
|--------------------------|-----------------------|------|
| humano shRNA1            | GCGGCAGCTAATGAAGAAATT | VP19 |
| humano shRNA2            | CGCCTTATGATGAATCTAAAT | VP20 |

**Primers para CHIP-qPCR**

| Target    | Direction | Sequence               | VP    |
|-----------|-----------|------------------------|-------|
| ABCC1 (A) | Forward   | GTTTGAGCTGAGCATGATGCC  | VP433 |
|           | Reverse   | TTGCCATGTGCTAAGCCTG    | VP434 |
| ABCC1 (B) | Forward   | CCCTTAGATTTAACCCCGGC   | VP435 |
|           | Reverse   | TCAAGACAGCAGACAGACA    | VP436 |
| ABCC1 (C) | Forward   | CTTGGTCTGTGATGACG      | VP437 |
|           | Reverse   | CCTAGACCTGAGACACCCA    | VP438 |
| RFN       | Forward   | CCAGTACTCTGCAACACG     | VP247 |
|           | Reverse   | ACTGCACCTCTGGGGCAC     | VP248 |
| ACHR      | Forward   | CCTTCATTGGGATCACCAGC   | VP245 |
|           | Reverse   | AGGAGATGATACCAGCAGGTTG | VP246 |

**Primers para qPCR**

| Target       | Direction | Sequence                      | VP    |
|--------------|-----------|-------------------------------|-------|
| Humano BPTF  | Forward   | AGCAAGCCAGTCAAAATCA           | VP29  |
|              | Reverse   | CCTGGCTGGAATGAAGTAA           | VP30  |
| Humano HPRT  | Forward   | GGCTGCTGATAGTGATGAT           | VP31  |
|              | Reverse   | CCATGAGGAATAAACACCTTT         | VP32  |
| Murino BPTF  | Forward   | AACAAGTTGTGACTCAATCATC        | VP7   |
|              | Reverse   | GAATCACTACTGTTAAACCTTGG       | VP8   |
| Murino HPRT  | Forward   | GGCAGACTTTGTGGATTG            | VP3   |
|              | Reverse   | TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT         | VP4   |
| Humano ABCC1 | Forward   | CTCTATCTCTCCGACATGACC         | VP389 |
|              | Reverse   | AGCAGACATCCAGACGAAAA          | VP390 |
| Humano ABCC2 | Forward   | CCCTGCTGTGATATCAACATC         | VP391 |
|              | Reverse   | TCGAGAGAATCCAGATAGGGAC        | VP392 |
| Humano ABCC3 | Forward   | TGGGGTAAATTTCTGACTGG          | VP393 |
|              | Reverse   | CACGTTTGAAGTGGTGTGATA         | VP394 |
| Humano ABCC4 | Forward   | AGCTGAGAAATGACGACAGAA         | VP395 |
|              | Reverse   | ATATGGGCTGATTAATTTGGC         | VP396 |
| Humano IL1a  | Forward   | AGATGCCTGAGATACCCAAAACC       | VP329 |
|              | Reverse   | CCAAGCACACCCAGTAGTCT          | VP330 |
| Humano IL1b  | Forward   | TCAGCACTCTCAAGCAGAA           | VP361 |
|              | Reverse   | TCACATTCAGCAGGACT             | VP362 |
| Humano IL6   | Forward   | AGTGAGGAAACAAGCCAGAGC         | VP201 |
|              | Reverse   | GTTGGGTCAAGGGTGGTTAT          | VP202 |
| Murino IL1a  | Forward   | TTGAAGACTTAAAGAACTGTTACAGTGAA | VP413 |
|              | Reverse   | GCCATAGCTGCAATAGAAGG          | VP414 |
| Murino IL1b  | Forward   | GCAACTGTTCTGAACTCAACT         | VP213 |
|              | Reverse   | ATCTTTGGGGTCCGCTCAACT         | VP214 |
| Murino IL6   | Forward   | CTGCAAGAGACTTCCATCCAG         | VP297 |
|              | Reverse   | AGTGGTATAGCAGGCTGTTGG         | VP298 |
| Murino Arg1  | Forward   | CAGAAGAATGGAAGAGTCAAG         | VP645 |
|              | Reverse   | CAGATATGAGGGAGTCAAC           | VP646 |
| Murino Arg1  | Forward   | CCTCTCTTAATCAGCCCTCTG         | VP617 |
|              | Reverse   | GAGGACCTGGGATGATGAG           | VP618 |
| Humano TNFa  | Forward   | CGTGACCACTACAACCTCGG          | VP633 |
|              | Reverse   | CATCCACAGCTCCACCCAG           | VP634 |
| Humano TGM2  | Forward   | ATTACCTCCGTTACCCGCTG          | VP635 |
|              | Reverse   | TAGGCTCTTATTGGCTCAG           | VP636 |



