

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

IMPLICANCIA DE LA ENZIMA Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) EN LA RESISTENCIA A DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS Y REGULACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DEPENDIENTES DE ENERGÍA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Ríos Medrano, Mayra Agustina – LU 1081063
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Orlando, Ulises Daniel. **Instituto de Investigaciones Biomédicas, INBIOMED
(UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires**

Co-Tutor:

Gargarello, Romina Mariel. **Universidad Argentina de la Empresa**

13-04-2021



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

Agradecimientos

La verdad es que tuve la suerte de poder desarrollar este trabajo en el mismo laboratorio donde me desempeñé como técnica asistente, por lo que primer agradecimiento es para el Dr. Ernesto Podestá y la Dra. Cristina Paz quienes confiaron en mí para trabajar en este hermoso Instituto, que es INBIOMED, y en especial al Dr. Podestá que me asignó al mejor director que me pudo haber tocado, el Dr. Ulises Orlando. Uli siempre me tuviste paciencia, me enseñaste, confiaste en mí y me dejaste opinar en todo momento, sos comprensivo, siempre de buen humor y tratando bien a todos los que te rodeamos, sos una gran persona y excelente profesional. Luego agradecerles a las Dras. Ana Fernanda Castillo y Paula Maloberti por el cariño con el que me tratan desde que entré al labo y por todo lo que día a día me enseñan, lo cual fue fundamental para el desarrollo de esta tesina. A mi co-directora la Dra. y profe Romina Gargarello, un ser hermoso y súper cálido por colaborar en la corrección y seguimiento de este trabajo, y con quien tuve la oportunidad de participar en un proyecto de investigación de la facultad que disfruté y aprendí mucho.

Básicamente este es un agradecimiento a las personas con las que trabajo diariamente y que me fueron formando a lo largo de estos años, dentro del laboratorio donde aprendo todos los días de cada uno de mis compañeros y colegas, los cuales pasaré a nombrar particularmente: Ceci, siempre buena onda y dispuesta a enseñarme; Fabiana, una genia por donde la mires y siempre pila; Isa, Sil y Ale, siempre tratándome con mucho amor; a mis amigas Mechi y Katia, ya que mis días laborales al lado de ellas son lo más; a las chicas Nadin y Lucía con las que hacemos un lindo equipo; Melina, Yanina, Jéssica, las bellas becarias; al team masculino formado por Nico, Juan, Mati, Dr. Horacio y Charly, que siempre tuvieron buena onda conmigo. Todas estas bellas personas que me tocaron de compañeros contribuyeron en lo que aprendí para poder hacer este trabajo y que todo sea más ameno.

También agradecer a mis mejores amigos que siempre están ahí para mí, y me alientan día a día con esta carrera hermosa que elegí, Shirin, Leila, Franco y Daiana.

Por último y el más importante de todos los agradecimientos y dedicatoria de esta tesina y de la carrera en sí, es para mi mamá Susana y mi papá Fernando. Sin ellos no sería quien soy hoy

ni hubiese llegado hasta acá sin su compañía y el amor que me dan todos los días. Los amo y gracias por dejarme elegir siempre qué quiero para mi vida. Y sin duda es esta carrera que elegí.

Tabla de contenido

Título del proyecto 6

Resumen..... 6

Abstract 8

1. INTRODUCCIÓN 9

 1.1 Cáncer..... 9

 1.2 Anatomía de la mama 10

 1.3 Cáncer de mama..... 11

 1.4 Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4)..... 13

 1.5 ACSL4 en cáncer 14

 1.6 ACSL4 en cáncer de mama 15

 1.7 Resistencia a tratamientos oncológicos..... 16

 1.8 Transportadores dependientes de energía..... 17

2. HIPÓTESIS 18

 2.1 Objetivo general 18

 2.2 Objetivos específicos..... 18

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 19

 3.1 Materiales..... 19

 3.2 Métodos 19

 3.2.1 Cultivo Celular 19

 3.2.2 Generación de líneas celulares estables 20

 3.2.3 Ensayos de sensibilidad celular 22

 3.2.4 Western blot..... 23

 3.2.5 Citometría de flujo- Evaluación de la acumulación intracelular de doxorubicina 24

 3.2.6 Ensayo de expulsión de Hoechst 33342..... 25

 3.2.7 Ensayo de expulsión de calceína AM 25

 3.2.8 Extracción de ARN y ensayo de qRT-PCR 25

 3.2.9 Análisis estadístico 26

4. RESULTADOS..... 26

 4.1 Generación de líneas celulares estables MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* 26

| | |
|---|----|
| 4.2 Evaluación de ACSL4 en la viabilidad celular luego del tratamiento con agentes quimioterapéuticos | 27 |
| 4.3 Modulación de la actividad de ACSL4 durante tratamientos con agentes quimioterapéuticos. | 30 |
| 4.4 Participación de ACSL4 en la expulsión de compuestos xenobióticos..... | 32 |
| 4.5 Efectos de ACSL4 sobre ARNm de transportadores dependiente de energía | 34 |
| 4.6 Efectos de ACSL4 en la expresión de proteínas y regulación de los transportadores dependientes de energía..... | 37 |
| 5. DISCUSIÓN | 43 |
| 6. CONCLUSIÓN | 47 |
| 7. PERSPECTIVAS FUTURAS | 48 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 49 |

Título del proyecto

Implicancia de la enzima Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) en la resistencia a drogas quimioterapéuticas y regulación de proteínas transportadoras dependientes de energía en líneas celulares de cáncer de mama.

Resumen

Acil-CoA sintetasa-4 (ACSL4) es una enzima implicada en la regulación negativa del receptor de estrógeno α (ER α) y en la resistencia a la hormonoterapia en cáncer de mama. Los tratamientos quimioterapéuticos de cáncer de mama metastásicos usualmente se enfrentan con el problema de la resistencia a la terapia asociada a la expresión de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*). Estas proteínas transportadoras se caracterizan por sensar y expulsar, mediante ATP, drogas oncológicas a través de la membrana celular. En este contexto, el objetivo central de este trabajo es estudiar el rol de ACSL4 en la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos y la relación con los transportadores ABC en los mecanismos subyacentes.

Para ello, se usaron como modelo biológico las líneas celulares inmortalizadas de cáncer de mama MDA-MB-231 *wt* (silvestres) y líneas modificadas genéticamente, MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MDA-MB-231 *mock*, que sobreexpresan ACSL4 respecto a las líneas MCF-7 Tet-Off vector vacío y MDA-MB-231 shRNA ACSL4.

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular (MTT), proliferación celular (BrdU), exflujo de fármacos (citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia), identificación de genes transportadores ABC de resistencia a fármacos que responden a ACSL4 (RNA-Seq), expresión del ARNm de los transportadores identificados, los niveles de proteínas y la participación de la vía de señalización (PCR en tiempo real y Western blot).

Tras el tratamiento quimioterapéutico en las líneas celulares MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* se obtuvieron altas tasas de supervivencia, efecto que se contrarrestó inhibiendo ACSL4 por medio de la inducción con doxiciclina o shRNA, respectivamente.

Se observó un efecto sinérgico de triacsina C, inhibidor de ACSL4, junto con fármacos quimioterapéuticos sobre la inhibición de la proliferación celular en la línea MDA-MB-231 *wt*. Las células MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 mostraron mayor exflujo de doxorubicina, Hoechst 33342 y calceína AM. Por el contrario, las células MDA-MB-231 shRNA ACSL4 evidenciaron inhibición en el exflujo de los fármacos quimioterapéuticos. ABCG2, ABCC4 y ABCC8 se identificaron como genes de resistencia a fármacos que responden a ACSL4, cuya expresión aumentó en células MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 pero inhibida en células MDA-MB-231 shRNA ACSL4, respecto a los correspondientes controles. Otros ensayos de supervivencia celular en presencia de Ko 143 y Ceefourina 1, inhibidores de ABCG2 y ABCC4, respectivamente, tras el tratamiento quimioterapéutico, mostraron una mayor participación de ABCG2 en la resistencia a los fármacos anti-tumorales en las células que sobreexpresan ACSL4. Además, la inhibición de ACSL4 y el tratamiento quimioterapéutico combinado con la inhibición de mTOR por rapamicina inhibieron sinérgicamente la proliferación celular y redujeron la expresión de ABCG2 en células que sobreexpresan ACSL4.

En conclusión, ACSL4 podría ser considerado un nuevo *target* terapéutico durante eventos asociados a la resistencia a drogas, regulando la expresión de los transportadores involucrados en la resistencia a drogas quimioterapéuticas a través de la vía de mTOR, y restaurando la sensibilidad a estas drogas en tumores con mal pronóstico.

Abstract

Acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) is an enzyme implicated in estrogen receptor α (ER α) negative regulation and hormone therapy resistance in breast cancer. Chemotherapeutic treatment of disseminated breast cancer is usually faced with therapy resistance associated to ATP-binding cassette (ABC) transporter expression, which detect and eject anti-cancer drugs from cells. In this context, the aim of the present work was to study the role of ACSL4 in anti-cancer drug resistance and the involvement of ABC transporters in the underlying mechanisms.

To this end, we used immortalized breast cancer lines MDA-MB-231 *wt* (wild type) and genetically modified lines MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 and MDA-MB-231 mock cells, which overexpress ACSL4, and control line MCF-7 Tet-Off empty vector, MDA-MB-231 shRNA ACSL4.

Assays were conducted on cell viability (MTT), cell proliferation (BrdU), drug efflux (flow cytometry and epifluorescence microscopy), identification of ACSL4-responsive drug resistance ABC transporter genes (RNA-Seq), transporter mRNA expression, protein levels and signaling pathway participation (real-time PCR and Western blot).

Higher survival rates upon chemotherapeutic treatment were obtained in MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 and MDA-MB-231 mock cells, an effect counteracted by doxycycline- or shRNA-induced ACSL4 inhibition, respectively. A synergic effect of ACSL4 inhibitor triacsin C and chemotherapeutic drugs was observed on the inhibition of MDA-MB-231 wild type cell proliferation. MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 cells showed greater doxorubicin, Hoechst 33342 and calcein AM efflux. In contrast, MDA-MB-231 shRNA ACSL4 cells evidenced inhibition of chemotherapeutic drug efflux. ABCG2, ABCC4, and ABCC8 were identified as ACSL4-responsive drug resistance genes whose expression was increased in MCF-7 Tet-Off/ACSL4 cells but inhibited in MDA-MB-231 shRNA ACSL4 cells. Further cell survival assays in the presence of Ko 143 and Ceefourin 1, inhibitors of ABCG2 and ABCC4, respectively, upon chemotherapeutic treatment showed greater participation of ABCG2 in anti-cancer drug resistance in cells overexpressing ACSL4. In addition, ACSL4 inhibition and chemotherapeutic treatment combined with rapamycin-induced mTOR inhibition synergically inhibited proliferation and reduced ABCG2 expression in cells overexpressing ACSL4.

In conclusion, ACSL4 may be regarded as a novel therapeutic target regulating the expression of transporters involved in anticancer drug resistance through the mTOR pathway to restore drug sensitivity in tumors with poor prognosis for disease-free and overall survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cuerpo humano está compuesto por diversos tipos celulares, entre ellas, células sanguíneas, epiteliales, óseas, musculares, nerviosas, adiposas, secretoras, etc. Estos tipos celulares tienen características muy particulares y funciones específicas, pero algo que comparten en común es la forma en la cual están programadas para ser eliminadas una vez finalizada su “vida útil”, es decir, si ya no son necesarias para el tejido u organismo, se dañan o envejecieron. Este proceso de muerte celular es denominado apoptosis y su finalidad es controlar el desarrollo y crecimiento normal de todas las células del cuerpo. En contraposición, cuando el crecimiento celular se torna desmedido y sin control se denomina neoplasia. El proceso neoplásico trae como consecuencia la formación de una masa o tumor. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Este primer grupo puede extirparse y no genera metástasis, y en la mayoría de los casos no reincide. En cambio los tumores malignos suelen ser metastásicos y generar cáncer.

Se puede definir al cáncer, como un conjunto de enfermedades relacionadas como consecuencia del crecimiento celular desmedido (división celular) y sin control. Este tipo de células tienen la capacidad de diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático e invadir otros tejidos del cuerpo. Este proceso se denomina metástasis.

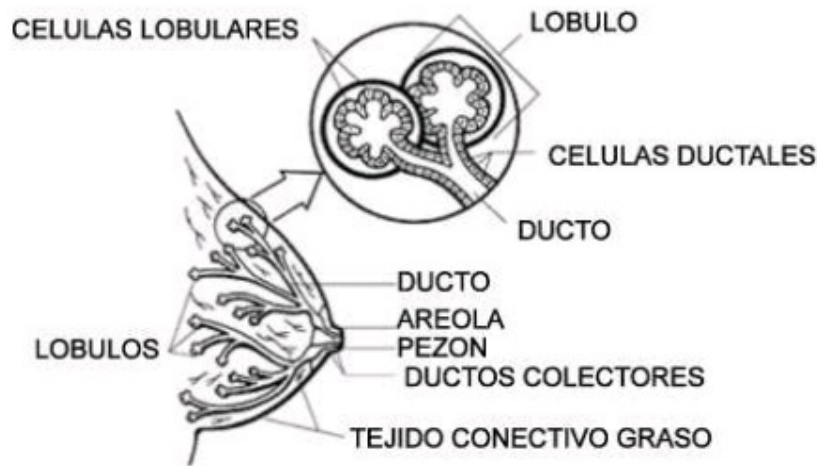
Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 9,9 millones de personas murieron de cáncer en el año 2020. Representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Respecto al continente americano, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población. Particularmente, Argentina presenta una tasa de incidencia de 218 casos por 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta (rango 177 a 245,6 por 100.000 habitantes), ubicándola a su vez en el séptimo

lugar en Latinoamérica, datos según las últimas estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC).

1.2 Anatomía de la mama

La mama es un órgano glandular ubicado en el pecho. Está formada por tejido conjuntivo, tejido graso y tejido mamario, el que contiene las glándulas que pueden producir la leche materna. La mama está compuesta por epitelio especializado y estroma que da lugar a lesiones benignas y malignas específicas de este órgano. Las células epiteliales mamarias forman un epitelio de dos capas y pueden separarse básicamente en dos compartimentos distintos: una capa interna en el lumen y una capa externa de células basales. Gran parte del estroma está constituido por tejido adiposo, a través del cual discurren los conductos linfáticos.

La glándula mamaria consta de dos elementos fundamentales: los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche, y los ductos, un conjunto de estructuras tubulares y huecas, ramificadas en forma de árbol, cuyas luces confluyen progresivamente en canalículos más y más gruesos hasta terminar en uno de los doce a dieciocho conductos centrales llamados galactóforos. Los alvéolos o acinos de la glándula mamaria están formados por células epiteliales secretoras y rodeadas por células mioepiteliales. Estos alvéolos se reúnen formando grupos llamados lóbulos y cada uno de estos lóbulos posee un ducto galactóforo (Macias & Hinck, 2012) (Esquema. 1).



Esquema 1: Estructura y anatomía de la glándula mamaria. En este esquema se puede observar la composición estructural, organización macroscópica y microscópica de la glándula mamaria.

1.3 Cáncer de mama

De los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial, el cáncer de mama (con una tasa de 48 casos por cada 100.000, incluyendo ambos sexos y abarcando todas las edades), es uno de los más importantes (Asia, Asia, & Hdi, 2020). Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) cada año más de 462,000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama en el continente Americano y casi 100,000 mueren a causa de esta enfermedad. Si las tendencias actuales continúan, para el año 2030, se prevé que el número de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama aumente en un 34%. En América Latina y el Caribe, el cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres y es el segundo en mortalidad.

En Argentina, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos. Más datos estadísticos, provistos por el Instituto Nacional del Cáncer (INC), arrojan que el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres argentinas, provoca más de 5.800 muertes por año. Luego de Uruguay, Argentina es el país de América con la tasa de mortalidad más alta por este tipo de cáncer y curiosamente el 1% de

los cánceres de mama se presenta en hombres. Además en el país se presenta una gran diferencia en la tasa de mortalidad entre las distintas jurisdicciones. La tasa ajustada más elevada se registró en San Luis (21 casos por cada 100.000 mujeres) y la más baja en Santiago del Estero (10,8 casos por cada 100.000 mujeres). Los últimos datos oficiales obtenidos por GLOBOCAN, en relación a nuestro país, señalan que el cáncer de mama es el de mayor prevalencia respecto a los demás, y que surgieron 22.024 nuevos casos en el 2020 (considerando ambos sexos y todas las edades)(Registry & Cancer, 2021).

Existen factores de riesgo conocidos para desarrollar cáncer de mama, tales como la herencia genética, la edad, los hábitos de alimentación no saludables, el consumo de tabaco y alcohol, el sedentarismo, entre otros. Mientras que algunos de estos factores no son modificables, los hábitos pueden ser cambiados para disminuir las probabilidades. Actualmente los organismos de salud a nivel mundial intentan difundir la prevención y detección temprana mediante la realización de mamografías, ecografías mamarias anuales y la autoexploración de las mamas.

La mayoría de los cánceres de mama son carcinomas, debido a que se originan de las células epiteliales. En particular, se denominan adenocarcinomas, ya que se forman a partir de células de revestimiento interno de glándulas de secreción externa, principalmente de células ductales (90% de los casos) o lobulillares (10% de los casos).

El cáncer de mama ha sido clasificado sobre la base de diferentes esquemas, tales como etiología, anatomía patológica, estadificación, sensibilidad a hormonas, subtipos moleculares, etc. (Yeo & Guan, 2018).

El adenocarcinoma de mama subtipo triple negativo (TNBC) es denominado como tal, por la ausencia del receptor de estrógeno alfa (RE α), ausencia del receptor de progesterona (PR) y por no sobreexpresar el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Es uno de los más alarmantes debido a su alta agresividad, gran capacidad de generar metástasis y resistencia a tratamientos hormonales y quimioterapéuticos. Los pacientes con TNBC presentan mal pronóstico, son insensibles tanto a las terapias convencionales como a la inmunoterapia, por lo que no existe un tratamiento adecuado para este tipo de patología (Wahba, H.A y H.A. El-Hadaad 2015). Por ello, el TNBC es un gran desafío de estudio, y es el que nos compete para el presente trabajo.

1.4 Acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4)

La enzima acil-CoA sintetasa 4, ACSL4, pertenece a una familia de 5 enzimas que catalizan la activación de ácidos grasos de cadena larga, de entre 12 a 20 átomos de carbono, mediante su esterificación con coenzima A formando el acil-CoA correspondiente (Kuwata & Hara, 2019). Esta subfamilia de proteínas juega un papel esencial en diversos procesos tales como, la biosíntesis de lípidos, la degradación de ácidos grasos (β -oxidación) y la remodelación de membranas. Particularmente, ACSL4 es una proteína periférica de membrana asociada a mitocondrias de 74 kDa, y se expresa preferencialmente en tejidos tales como: glándula adrenal, testículos, ovario, placenta, cerebro, hígado, epidídimo y pulmón (Yang Cao, Murphy, McIntyre, Zimmerman, & Prescott, 2000; Kang et al., 1997; P. Maloberti et al., 2005). Respecto a su actividad, esterifica principalmente ácido araquidónico (AA) (Kang et al., 1997). Este ácido posee 20 carbonos y comúnmente se encuentra en los fosfolípidos de la membrana celular. El AA es el precursor común de los eicosanoides, una familia de lípidos con un papel clave en fisiología y fisiopatología (Crapanzano & Balistreri, 2015; Harizi, Corcuff, & Gualde, 2008). En condiciones fisiológicas normales la presencia del AA intracelular es baja respecto a otros ácidos grasos no saturados. ACSL4 jugaría un papel importante en la esterificación del AA libre, el cual además es capaz de regular la expresión de esta enzima (Kang et al., 1997).

ACSL4 se expresa preferentemente en tejidos esteroideogénicos (Coleman, Lewin, Horn, & Gonzalez-baro, 2002), lo que evidencia la existencia de una relación entre la presencia de esta proteína y la actividad esteroideogénica. En nuestro laboratorio se demostró que la síntesis de *novo* de ACSL4 está involucrada en un paso temprano en la liberación de AA, la inducción de la proteína StAR (proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda) y la producción de esteroides estimulada por las hormonas tróficas a través de una fosforilación dependiente de AMPc (adenosín monofosfato-3',5' cíclico) (P. Maloberti et al., 2005, 2002). Asimismo, se reportó que el control hormonal sobre los niveles AA-CoA se produce a través de la inducción de ACSL4, lo que concuerda con el hecho de que se necesita un control estricto en la concentración intracelular de los ésteres de ácido graso y CoA, ya que son importantes intermediarios en el metabolismo lipídico y actúan como moléculas de señalización (P. Maloberti et al., 2002).

Otros procesos fisiológicos en donde participa ACSL4: la modulación de la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂) en células humanas del músculo liso arterial (Golej et al., 2011), la regulación del transporte de vesículas sinápticas en *Drosophila melanogaster* (Liu, Huang, Zhang, Chen, & Zhang, 2011) y en la embriogénesis del pez cebra (Anderson, Hammerschmidt, Miyares, Stein, & Farber, 2013). También se ha descrito que ACSL4 está involucrada en una nueva forma de muerte celular regulada, ferroptosis. Este mecanismo se trata de una necrosis regulada por la enzima Glutathion peroxidasa 4. La desregulación de la ferroptosis está implicada en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la muerte de células tumorales, neurotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, hepatotoxicidad inducida por drogas, fallas renales agudas, lesión por isquemia/reperfusión hepática y miocárdica entre otras (J. Li et al., 2020).

En procesos patológicos, se ha encontrado que la ausencia del gen *ACSL4* podría tener implicancia en el desarrollo del síndrome de Alport, eliptocitosis y trastornos de retraso mental (Piccini et al., 1998).

1.5 ACSL4 en cáncer

La asociación de ACSL4 con el cáncer se ha inferido de la expresión anormal en carcinoma de colon, mama, ovario, próstata, hepatocelular, glioma, entre los más estudiados (Y. Cao, Dave, Doan, & Prescott, 2001; Dattilo et al., 2020; Monaco et al., 2010; Sung et al., 2003).

Nuestro grupo de trabajo ha descrito el rol de ACSL4 en el aumento de la agresividad tumoral en cáncer de mama (P. M. Maloberti et al., 2010; Orlando et al., 2015, 2012), como detallaré en la siguiente sección.

En relación a cáncer de próstata se demostró que, tanto en líneas celulares y muestras de tumores de pacientes, los niveles incrementados de ACSL4 se relacionan con disminución de la expresión del receptor de andrógenos (AR) o con la insensibilidad a los andrógenos en cáncer de próstata, por lo cual se postuló que la expresión de ACSL4 es indicativa de insensibilidad a los andrógenos, posicionando a ACSL4 como un potencial biomarcador de los cánceres de próstata resistentes a la castración (Wu et al., 2015).

En líneas de carcinoma hepatocelular (HCC) se ha demostrado que, silenciando ACSL4, mejora el efecto de las drogas que se utilizan para tratar este tipo de cáncer (Feng et al., 2021). Inclusive se comprobó que analizando la expresión de ACSL4 y ACSL3 se puede distinguir diferentes tipos de tumores hepáticos (Ndiaye et al., 2020).

En estudios de cáncer de colon se comprobó que ACSL4 participa activamente en la reprogramación metabólica, mejorando la adaptación metabólica de células tumorales altamente invasivas (Sánchez-Martínez, Cruz-Gil, García-Álvarez, Reglero, & De Molina, 2017).

Sin embargo, en glioma ACSL4 tiene un efecto anti-proliferativo. La sobreexpresión de la enzima disminuye la expresión de glutatión peroxidasa 4 e incrementa los niveles de marcadores ferroptóticos, lo que demuestra que ACSL4 protege las células del glioma y ejerce un efecto anti-proliferativo activando una vía de ferroptosis. (Cheng et al., 2020).

1.6 ACSL4 en cáncer de mama

La enzima ACSL4 se encuentra asociada a diferentes aspectos que hacen al desarrollo del cáncer de mama. En trabajos realizados en nuestro laboratorio como también en otros grupos de trabajo, se ha demostrado la asociación entre la sobreexpresión de ACSL4 en líneas celulares de cáncer mama y la generación de un fenotipo altamente agresivo (Orlando et al., 2015; Wu et al., 2013). A nivel molecular quedó demostrado que ACSL4 regula la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) como también de productos lipoxigenados. En un intento por revelar los primeros pasos a través de los cuales ACSL4 aumenta el crecimiento y la progresión tumoral, nuestro grupo ha reportado un papel clave para la expresión de ACSL4 en la biología de las células cancerosas, regulando genes y mecanismos de transducción de señales subyacentes a la proliferación, migración e invasión (Castillo et al., 2015). Esta enzima regula la vía mTOR/AKT, mediante la vía de la lipoxigenasa 5 (LOX-5) en células provenientes de cáncer de mama altamente agresivas (Orlando et al., 2015).

Se estudio el promotor ACSL4 y se identificó al factor de transcripción receptor alfa relacionado con estrógenos (ERR α) como activador principal de este promotor en cáncer de mama triple negativo (Dattilo et al., 2019). En conclusión, el rol de ACSL4 es muy importante

durante la progresión tumoral, dado que se encuentra implicada en la regulación negativa del REa evitando que tratamientos anti-hormonales sean efectivos (Orlando et al., 2015)

1.7 Resistencia a tratamientos oncológicos

Generalmente, los tratamientos contra el cáncer diseminado enfrentan obstáculos asociados a la resistencia. Debido a los fracasos frente a ciertas terapias, desde hace años se llevan a cabo investigaciones para dilucidar cuales son los mecanismos que emplean las células cancerosas para eludir los tratamientos para destruirlas. Algunos de los mecanismos implicados en resistencia a tratamientos están relacionados a proteínas transportadoras de la membrana celular, alteraciones en enzimas (como las topoisomerasas) o en sistemas detoxificantes conjugados a glutatión. Uno de los mecanismos de resistencia a agentes quimioterapéuticos más estudiados es el que se encuentra asociado a la expulsión de las drogas fuera de la célula, generado por proteínas transportadoras denominadas ABC (*ATP-binding cassette*). Los transportadores ABC, son proteínas dependientes de energía que en condiciones fisiológicas normales se encargan de expulsar sustancias ajenas a la células o metabolitos, y en condiciones patológicas se sabe expulsan diversas drogas proporcionadas como terapia (M Dean et al. 2001).

La resistencia al tratamiento farmacológico contra el cáncer se debe a una amplia gama de factores que incluyen variaciones individuales en los pacientes y diferencias genéticas de células somáticas, incluso en tumores con un tejido de origen común. Aunque con frecuencia es intrínseco al cáncer, la resistencia de las células cancerosas también puede adquirirse durante el curso de la terapia.

La adquisición de resistencia puede responder a la expresión de uno o más transportadores dependientes de energía que expulsan fármacos de las células, o puede resultar de resistencia hormonal, insensibilidad a la apoptosis inducida por fármacos o inducción de desintoxicación de drogas (Gottesman, 2002; Zahreddine & Borden, 2013). Por lo tanto, un diseño de medicamentos totalmente efectivo contra el cáncer requiere una mejor comprensión de la biología tumoral y los mecanismos moleculares de resistencia recién mencionados.

1.8 Transportadores dependientes de energía

Los mencionados transportadores de membrana ABC dependientes de ATP son una superfamilia de proteínas conservadas evolutivamente cuya función es sensar y expulsar metabolitos y otros agentes tóxicos del interior celular. Estos transportadores se agrupan en las siguientes subfamilias ABC: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCG.

En mamíferos, estos transportadores se expresan predominantemente en el hígado, intestino, barrera hemato-encefálica, barrera hemato-testicular, placenta y riñón. Una de las características importantes de estas proteínas es que tienen una amplia especificidad de sustratos, pudiendo transportar de forma activa compuestos de distinta naturaleza, muchos de ellos con importantes acciones terapéuticas en dianas celulares. En condiciones fisiológicas normales, las proteínas ABC transportan una serie de sustratos endógenos, incluidos aniones inorgánicos, iones metálicos, péptidos, aminoácidos, azúcares y una gran cantidad de compuestos y metabolitos hidrófobos a través de la membrana plasmática y también a través de las membranas intracelulares (M Dean et al. 2001). Por el contrario, dadas condiciones patológicas en el organismo, este transporte puede ser responsable de la resistencia a múltiples drogas (*multiple drug resistance* o MDR) en cáncer. El conocimiento y modulación de estas proteínas es sumamente necesario para optimizar distintos tipos de terapias o para controlar la eliminación de tóxicos (W. Li et al., 2016).

Diversos trabajos demuestran que la sobreexpresión de determinados transportadores ABC, como por ejemplo ABCB1, está directamente relacionada con la generación de resistencia a drogas quimioterapéuticas en cáncer de mama (Lim, Jung, & Park, 2019). A su vez, se está estudiando cómo mejorar la sensibilidad y retención de drogas dentro de las células tumorales regulando la expresión de transportadores, por medio de nanopartículas u otros compuestos (Das, Mukherjee, Chatterjee, Jamal, & Chatterji, 2019).

Otro transportador de esta familia, ABCG2, actúa fisiológicamente como parte de un mecanismo de autodefensa para el organismo, mejora la eliminación de sustancias xenobióticas tóxicas y agentes nocivos en el intestino, a través de la barrera hematoencefálica y la placenta. En cuanto su acción en patologías como el cáncer, ABCG2 contribuye en la resistencia a múltiples fármacos anti-tumorales al provocar, principalmente, la expulsión de

estos agentes fuera de la célula, evitando así su acción terapéutica. En múltiples estudios hechos en células tumorales, como por ejemplo de cáncer gástrico (Takegawa et al., 2017) y de mama, se halló que la sobreexpresión de ABCG2 se correlaciona con altos niveles de resistencia a una variedad de agentes antitumorales que incluyen antraciclinas, mitoxantrona y camptotecinas (Mao & Unadkat, 2005).

En relación a ABCC4, se encontró que estaba sobreexpresado en células de cáncer de próstata que presentaban resistencia a quimioterapéuticos de uso convencional (H. Huang et al., 2020). Además, otros estudios demostraron que silenciando el gen de ABCC4, en cáncer gástrico, se revertía la resistencia a drogas quimioterapéuticas (G. Zhang, Wang, Qian, Zhao, & Sun, 2015).

2. HIPÓTESIS

Por todo lo descripto anteriormente, queda demostrado el rol relevante de la enzima ACSL4 en la biología celular del cáncer, en relación a genes reguladores y mecanismos de transducción de señales subyacentes a la proliferación, migración e invasión celular. En este contexto, se planteó la hipótesis de que ACSL4 podría estar implicada en la resistencia a la terapia quimioterapéutica a través de su acción sobre los transportadores ABC, y que su regulación negativa o inhibición en células de cáncer de mama triple negativo podría brindar un aporte positivo para un futuro enfoque terapéutico efectivo.

2.1 Objetivo general

Caracterizar el papel de la enzima ACSL4 en el mecanismo de resistencia a tratamientos quimioterapéuticos y la implicancia de proteínas transportadoras ABC dependientes de energía en la agresividad celular en líneas de cáncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- ❑ Analizar el rol de ACSL4 durante tratamientos con drogas quimioterapéuticas en modelos celulares de cáncer de mama de alta agresividad.
- ❑ Evaluar el efecto de ACSL4 sobre transportadores ABC dependientes de energía en líneas de cáncer de mama de alta agresividad.

- ❑ Determinar qué vías y mecanismos regulan los transportadores ABC dependientes de energía relacionados con la resistencia a drogas en líneas celulares de cáncer de mama.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alta glucosa, penicilina-estreptomycin (P-S) y trispina- EDTA marca GIBCO, Invitrogen Corporation (Grand Island, NY, USA). Suero fetal bovino (SFB) comprado en laboratorios PAA GmbH (Pasching, Austria). Doxiciclina, 3-(4-5-dimetil-2-tiazol-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio) (MTT) adquirido a Sigma Chemical Co (San Luis, Misuri, Estados Unidos). Los anticuerpos primarios; ABCC4, ABCC8 y ABCG2 fueron comprados en Origene Technologies (Rockville, MD, USA). Los anticuerpos secundarios, la peroxidasa de rábano picante conjugada cabra anti-conejo, cabra-anti-ratón y la membrana de fluoruro de polivinilideno fueron comprados en Laboratorios BioRad (Hercules, CA, USA). El anticuerpo policlonal de conejo para humanos anti-ACSL4 fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio. El kit de quimioluminiscencia mejorada (ECL) fue comprado en GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Los materiales plásticos y estériles utilizados para cultivo celular fueron comprados en Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Bélgica). El kit de ELISA de proliferación celular 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) fue comprado en Roche Diagnostics (Basel, Suiza). El Trizol reagent obtenido de Molecular Research Center. El medio Opti-MEM y la Lipofectamine 2000 reagent son de Invitrogen (Carlsbad, California, Estados Unidos). El kit de midi prep, Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System es de Promega (Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama MDA-MB-231 *wt* (silvestres) y MCF-7 *wt* (silvestres) fueron donadas al instituto por el Centro Integral de Cáncer

“Lombardi” (Georgetown University Medical Center, Washington D.C, USA) en Marzo de 2010. A nivel molecular, la línea MDA-MB-231 sobreexpresa ACSL4 de manera basal, proviene de un fenotipo altamente agresivo y es usada comúnmente como modelo para estudiar cáncer de mama triple negativo (TNBC). Por el contrario, la línea MCF-7 presenta baja expresión de la enzima ACSL4, su fenotipo es menos agresivo y tiene receptor de estrógeno. (P. M. Maloberti et al., 2010)

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo (MCF-7 Tet-Off-vector vacío, MCF-7 Tet-Off/ ACSL4, MDA-MB-231 shRNA ACSL4, MDA-MB-231 mock y MDA-MB-231 wt) crecieron en DMEM alta glucosa con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomina (P-S), considerando a esta composición como medio completo, en estufa de cultivo celular eucariota a 37° C, con atmósfera humidificada y 5% de dióxido de carbono.

Las líneas celulares reprimibles por tetraciclina o doxiciclina MCF-7 Tet-Off vector vacío y MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 se desarrollaron anteriormente en nuestro grupo de trabajo (P. M. Maloberti et al., 2010). Para evaluar la funcionalidad del sistema *tet-off*, se sembraron ambas líneas en placas de 6 pocillos con una concentración celular de 5×10^5 con medio DMEM alta glucosa completo, dentro de una estufa específica para cultivo celular a 37° C, con inyección de 5% de dióxido de carbono y humedad controlada. Se les colocó doxiciclina (2 mg/ml) durante 48 hs, tanto en MCF-7 Tet-Off vector vacío como en MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y luego se procesaron las muestras obteniendo un lisado celular que permitió evaluar la expresión de ACSL4 por medio de *western blot*. Después de corroborar la regulación de ACSL4, se siguió con los experimentos. Estas líneas se utilizaron en pasajes entre 3-15 luego de ser descongeladas.

3.2.2 Generación de líneas celulares estables

La transfección celular es un proceso por el cual se incorpora ADN foráneo (generalmente en forma de plásmidos) a células eucariotas.

A partir de la línea celular MDA-MB-231 *wt* (*silvestres*), que es la línea inmortalizada sin modificaciones genéticas, se generaron 2 nuevas líneas. Debido a que esta línea sobreexpresa ACSL4 de manera basal, el objetivo consistió en silenciar la expresión endógena

de ACSL4, utilizando un plásmido que contiene una secuencia de ARN de horquilla corta (shRNA) para este gen. La nueva línea se nombró como MDA-MB-231 shRNA ACSL4. Por otro lado, la línea desarrollada como control se transfectó con un plásmido vacío, y se la denominó MDA-MB-231 *mock*.

Para la preparación de estas líneas se construyó un vector, utilizando como base el plásmido comercial pcDNA3.1 (+) (Invitrogen), con el fin de insertar el cDNA (ácido desoxirribonucleico copia) de ACSL4 junto con el plásmido pSUPER.retro (OligoEngine, Seattle, Washington, EE.UU), que contiene la secuencia del shRNA ACSL4 (5' AAGATTATTCTGTGGATGA 3') o el plásmido control. A partir de una cepa de bacterias competentes de E.coli XL1, se amplificaron los plásmidos de interés. Una vez hecho esto y habiendo seleccionado las bacterias que incorporaron el vector (colocando en el medio de cultivo bacteriano el antibiótico que se encuentra presente en la construcción del plásmido), se procedió a lisar las bacterias para luego purificar el ADN plasmídico. La purificación se realizó por medio de un kit de midi prep, siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega). Luego de este proceso, los distintos plásmidos se transfectaron por separado en la línea MDA-MB-231 *wt* en una placa de 12 pocillos (6 para cada línea), y se dejaron crecer hasta llegar a un 80% de confluencia. La transfección se realizó en medio Opti-MEM y con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), según instrucciones del fabricante. La presión de selección de las células que incorporaron el plásmido se hizo con el antibiótico puomicina (1 μ l/ml), agregándolo día por medio al medio de cultivo durante el crecimiento celular. Esta selección duró aproximadamente 35 días hasta obtener los clones de células que incorporaron el respectivo plásmido transfectado a su genoma. Para chequear que las células transfectadas hayan incorporado el ADN foráneo se sembraron ambas líneas celulares en placas de 12 pocillos (6 con MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y 6 con MDA-MB-231 *mock*), con una densidad celular de 2.5×10^5 y se dejaron crecer en estufa de cultivo por 72 hs. Luego se realizaron 2 experimentos por separado. En primer lugar, se extrajo el ARN total a partir del reactivo TriReagent, siguiendo instrucciones del proveedor para posteriormente hacer un ensayo de RT-PCR, seguido por una PCR de punto final para determinar si el plásmido había sido incorporado y si la expresión de ACSL4 había sido regulada. Por otro lado, a modo de determinar diferencias de expresión de esta proteína entre

las líneas transfectadas, se realizó la técnica de *western blot* con anticuerpo anti ACSL4. La descripción de esta técnica se encuentra en detalle en el sector **3.2.4 Western blot**.

3.2.3 Ensayos de sensibilidad celular

Para estudiar viabilidad y proliferación celular se utilizaron los kits de MTT y BrdU, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El MTT es un ensayo colorimétrico que mediante la reducción de sales amarillas de tetrazolio (como lo es el compuesto MTT) a cristales violetas de formazán sirve para medir la actividad metabólica de las células, principalmente la de las deshidrogenasas mitocondriales. Cabe destacar, que también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Estos ensayos se llevaron a cabo para evaluar el impacto de la enzima ACSL4 sobre la capacidad de las células a resistir a tratamientos con agentes quimioterapéuticos. El procedimiento consistió en sembrar las distintas líneas celulares en placas de 96 pocillos con una densidad aproximada de 1500 células por pocillo en medio DMEM alta glucosa completo, *overnight* (O.N, aproximadamente 16-18 hs), en estufa de cultivo celular a 37° C, condiciones controladas de humedad y CO₂ al 5%. Luego de dejarlas crecer, se les cambió el medio, pero esta vez sin SFB y se las dejó en esta condición por 24 hs, nuevamente en estufa. Pasadas las 24 hs de depleción de suero, se colocó nuevamente medio completo a cada línea con distintas concentraciones de agentes quimioterapéuticos, de cisplatino 1.0, 2.5 y 5.0 μM, de doxorrubicina 0.025, 0.050 y 0.100 μM y de paclitaxel 0.1, 0.2 y 0.5 μM. El tiempo de exposición a cada droga con su respectiva concentración fue de 48 hs. En las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío se agregó, además de las concentraciones de cada droga mencionada, otra variante con doxiciclina (2 μg/ml) para poder evaluar el sistema de *tet off* de regulación del gen ACSL4. Posterior a esta exposición, se agregó el compuesto MTT durante 2:30 hs a 37° C, con una concentración final de 0.5 mg/ml. Después de la incubación con MTT, los cristales de formazán fueron disueltos con dimetil sulfóxido (DMSO). Para concluir el ensayo, se determinó la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas de multi-detección, Synergy HT, Biotek (Winooski, Vermont, USA).

El kit de BrdU también es un test colorimétrico y se utiliza para medir la incorporación de BrdU (bromodeoxiuridina), análogo de la timidina, durante la síntesis de ADN en células que están proliferando. Cabe destacar que este ensayo se realizó únicamente en la línea MDA-MB-231wt. Se utilizaron las mismas drogas que para el MTT, pero con las siguientes concentraciones; doxorubicina 0.025 μM , cisplatino 1.0 μM , paclitaxel 0.1 μM . Además, se incorporó un inhibidor de la actividad de ACSL4, triacsina C, en tres concentraciones diferentes, 0.01, 0.05 y 0.10 μM . La exposición a los quimioterapéuticos fue durante 96 hs. A modo de evaluar la proliferación celular se colocó la solución de BrdU por 2:30 hs a 37 ° C en estufa. A partir de este paso se trabajó a temperatura ambiente (T.A). Para cortar la reacción, se aspiró cuidadosamente el medio con la solución de BrdU, luego se agregó una solución fijadora durante 30 minutos (el kit la trae lista para usar), después se colocó la solución con el anticuerpo anti-BrdU durante 1:30 hs, se aspiró la solución y se lavó con buffer fosfato salino (PBS) por triplicado. Por último, se incorporó la solución que genera color (que viene lista con el kit) durante 5-6 min, y una vez que el color apareció, se cortó la reacción con ácido sulfúrico 25 mM. Para la lectura final del experimento se utilizó el mismo equipo que para el MTT, pero determinando la absorbancia a 690 nm.

3.2.4 Western blot

Para evaluar la expresión diferencial de proteínas se utilizó la técnica de *western blot*. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (todas las líneas mencionadas anteriormente en la sección **3.2.1 Cultivo Celular**), se dejaron crecer en medio completo DMEM alta glucosa hasta llegar a la confluencia celular deseada (entre 60%-80%). Luego se retiró el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS por triplicado y se le colocó a cada pocillo buffer RIPA (una solución de lisis que contiene detergentes, sales para mantener el pH e inhibidores de proteasas) con el fin de irrumpir las membranas celulares y obtener las proteínas. Después se trasvasó cada lisado celular a un *ependorf* de 1.5 ml y se centrifugó a 5000 xg por 10 minutos. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por medio del método Bradford (basándose en una curva de calibración de seroalbúmina bovina (BSA) con concentración y absorbancia conocida). Una vez hecho esto, se trabajó con 40 μg de proteínas, las cuales fueron tratadas por el método de SDS-PAGE y electro-transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno. Estas membranas fueron incubadas en una solución

de leche en polvo descremada al 5% (con el fin de bloquear cualquier otra proteína que no fuera de nuestro interés) en buffer T-TBS (buffer tris salino, compuesto por: NaCl 500 mM, Tris-Hcl 20 mM pH 7.5 y Tween 20 0.5%) durante 1 h en agitación suave y a T.A. Después de esta incubación se lavó por triplicado con T-TBS y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente O.N a 4°. Las diluciones de los anticuerpos utilizados fueron; 1:1000 para ACSL4, ABCG2, ABCC8 y ABCC4 y 1:3000 para la β -tubulina (proteína *housekeeping* usada como control de carga). Todos los anticuerpos, excepto anti- β -tubulina, que es anti-ratón, son anti-conejo con una dilución de 1:5000, en T-TBS. Ambos anticuerpos secundarios están conjugados con la peroxidasa *horseradish* (mencionada en la sección **3.1 Materiales** como peroxidasa de rábano picante conjugada cabra anti-conejo y cabra-anti-ratón), por ende fueron detectados por quimioluminiscencia. Finalmente los *immunoblots* fueron cuantificados usando el programa Gel Pro Analyzer y normalizados con β -tubulina.

3.2.5 Citometría de flujo- Evaluación de la acumulación intracelular de doxorrubicina

El ensayo de exflujo de compuestos permite evaluar uno de los mecanismos asociados a la resistencia tumoral. Se realizó con doxorrubicina, ya que este compuesto emite fluorescencia *per se*, y es por ello que es muy usado para medir los sistemas de exflujo celular. Esta medición se realizó por medio de un citómetro de flujo. Las líneas evaluadas fueron MDA-MB-231 shRNA ACSL4, MDA-MB-231 *mock* (en presencia y ausencia de triacsina C 1 μ M), MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío. Se sembraron en pocillos individuales de 35 mm en medio DMEM completo y cuando alcanzaron una densidad celular de 2×10^6 se les colocó 1 μ M de doxorrubicina durante 1 h protegidos de la luz. Luego se lavaron e incubaron en medio sin doxorrubicina durante 2 hs. Por último, las células fueron tripsinizadas, recolectadas en tubos falcon, centrifugadas a 900 rpm, lavadas con buffer PBS por duplicado y resuspendidas en una solución de PBS y SFB al 2% v/v. La autofluorescencia de la doxorrubicina fue analizada inmediatamente por citometría de flujo con el equipo FACSCalibur II (Becton Dickinson Biosciences), usando excitación con láser de argón y detectada en un canal FL2 (excitación 488 nm, emisión 530 nm).

3.2.6 Ensayo de expulsión de Hoechst 33342

El compuesto fluorescente Hoechst 33342 utilizado para este ensayo de exclusión fue siguiendo el protocolo de Kong et al. (2015) con modificaciones menores (Kong et al., 2015). Hoechst 33342 tiene la particularidad de introducirse al núcleo celular, marcar el ADN y ser detectado mediante microscopio de epifluorescencia. Primero las células se incubaron en medio DMEM completo con 5 μg / ml de Hoechst 33342, protegiendo el ensayo de la luz durante 10 min a 37 ° C. Se utilizó una densidad celular aproximada de 2×10^4 . Luego, se realizó un lavado con PBS y se les colocó nuevamente medio de cultivo completo durante 10 min, pero sin el compuesto. La tinción de Hoechst 33342 fue monitoreada por microscopía de epifluorescencia usando el canal de excitación de 405 nm.

3.2.7 Ensayo de expulsión de calceína AM

La calceína AM es un colorante para tinción celular que no fluoresce *per se*, pero al ser incorporado por células vivas a través de la membrana plasmática, las enzimas esterases se encargan de transformar la calceína AM en calceína, y ésta si fluoresce *per se*. Este ensayo se realizó en las líneas MDA-MB-231 shRNA ACSL4, MDA-MB-231 *mock* (en presencia o ausencia de triacsina C (1 μM) y en las MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío. Se incubaron en DMEM completo con 0.5 μM de calceína AM, protegidas de la luz durante 30 min en estufa a 37 ° C. Luego las células se lavaron e incubaron en medio libre de calceína AM durante 30 min. Se recolectaron las células y después del tratamiento con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en una solución con PBS y SFB al 2% v/v. La calceína AM acumulada en las células se midió inmediatamente mediante citometría de flujo. El equipo utilizado fue un FACSCalibur II (Becton Dickinson Biosciences), usando excitación con láser de argón a 488 nm y un canal de detección de FL2 (excitación 488 nm, emisión 530 nm).

3.2.8 Extracción de ARN y ensayo de qRT-PCR

Los ensayos de qRT-PCR o PCR en tiempo real se realizaron como anteriormente estaba descrito con ligeras modificaciones (Castillo et al., 2015). El ARN total de las líneas

MCF-7 Tet-Off vector vacío y MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 se extrajo usando el reactivo Tri-Reagent (Centro de Investigación Molecular, Cincinnati, OH, EE. UU.). El ADN genómico residual se eliminó tratando el ARN con DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La transcripción inversa se realizó con el ARN total (2 µg) utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la PCR en tiempo real, se obtuvieron cebadores específicos de genes de RealTimePrimers.com (Elkins Park, PA, EE. UU.). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo Mic PCR (Biomolecular Systems, Australia). Todas las reacciones se hicieron por triplicado. La amplificación se inició mediante una incubación de 3 min a 95 ° C, seguida de 45 ciclos a 95° C durante 15 s, 60 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 30 s. Los niveles de expresión de ARNm del gen se normalizaron con la expresión de ARN 18S humano, realizada en paralelo como control endógeno. Los datos de la PCR en tiempo real se analizaron calculando el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método Ct comparativo) para cada muestra experimental.

3.2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo usando el programa GraphPad InStat Software 3.10 (La Jolla, CA, USA). La significancia estadística fue determinada a través del análisis de la varianza (ANOVA) seguida por el test de Tukey para comparaciones múltiples.

4. RESULTADOS

4.1 Generación de líneas celulares estables MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock*

Mediante *Western blot* se demostró que la línea MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 expresaba menores niveles de ACSL4 respecto a su control, MDA-MB-231 *mock* (Fig. 1), demostrando que el sistema se encuentra activo.

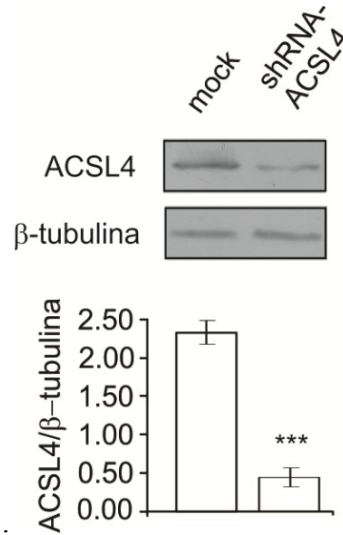


Fig. 1. Corroboración del silenciamiento génico de ACSL4 en la nueva línea MDA-MB-231 shRNA ACSL4. Los extractos de proteínas fueron obtenidos de las células MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock*, luego analizados por *western blot* utilizando el anticuerpo indicado. La densidad óptica integrada de los niveles de proteínas se cuantificó y normalizó con la correspondiente señal de β -tubulina. Los datos representan las medias \pm D.S de tres experimentos. *** $p < 0,001$

4.2 Evaluación de ACSL4 en la viabilidad celular luego del tratamiento con agentes quimioterapéuticos

Con el objetivo de evaluar el efecto de ACSL4 en la viabilidad celular luego del tratamiento con agentes quimioterapéuticos, las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío, fueron desafiadas con cisplatino, doxorubicina y paclitaxel. El tratamiento con cisplatino reveló efectos inhibitorios significativos en la línea MCF-7 Tet-Off vector vacío, en comparación con la línea MCF-7 Tet Off/ ACSL4, entre 1 μ M y 5 μ M. A su vez, la doxorubicina produjo diferencias significativas entre 0.025 μ M y 0.1 μ M, mientras que paclitaxel presentó diferencias significativas entre 0.1 μ M y 0.5 μ M (Fig. 2A, B y C, respectivamente). Un dato muy interesante se observó al modular la expresión de ACSL4 con el sistema Tet-Off, ampliamente utilizado por nuestro grupo de trabajo (P. M. Maloberti et al., 2010; Orlando et al., 2015, 2012), el cual permite la disminución de la expresión de ACSL4 mediante el uso de doxiciclina. De esta forma, se inhibe la expresión de ACSL4 (en la línea MCF-7 Tet-Off/ ACSL4) y se demuestra que la tasa de supervivencia celular con los tres fármacos fue comparable a los valores control (MCF-7 Tet-Off vector vacío).

Por otro lado, se evaluó lo que ocurría en las líneas celulares MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* cuando eran expuestas a los tres agentes quimioterapéuticos mencionados en el párrafo anterior. Una vez más, cisplatino mostró efectos inhibitorios significativamente más altos en la supervivencia celular de la línea MDA-MB-231 shRNA ACSL4 que en células MDA-MB-231 *mock*, entre 1.0 μM y 5.0 μM . También la exposición a doxorubicina produjo efectos inhibitorios significativos entre 0.025 μM y 0.05 μM , lo mismo ocurrió con paclitaxel entre las concentraciones 0.1 μM y 0.2 μM (Fig. 2D, E y F, respectivamente).

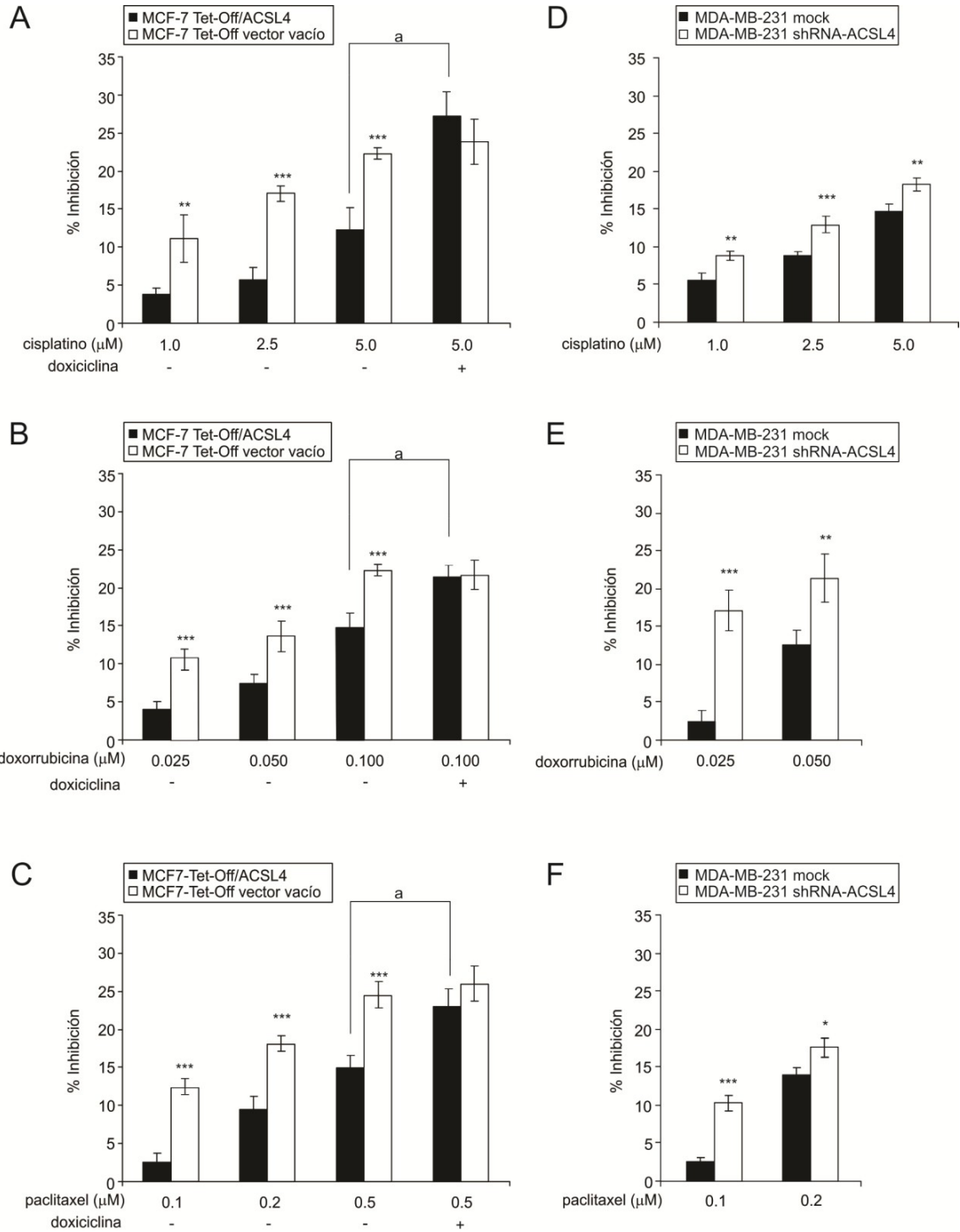


Fig. 2. Participación de la expresión de ACSL4 en la inhibición de la viabilidad celular causada por agentes quimioterapéuticos en los modelos celulares MCF-7 Tet-Off y MDA-MB-231 shRNA. Las líneas MCF-7 Tet-Off vector vacío y MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 fueron tratadas con A) cisplatino (1.0– 5.0 μ M), B) doxorubicina (0.025– 0.100 μ M), C) paclitaxel (0.1– 0.5 μ M) y doxiciclina (2 μ g/ml). Las líneas MDA-MB-231 *mock* y MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 fueron tratadas con D) cisplatino (1.0– 5.0 μ M), E) doxorubicina (0.025– 0.050 μ M) y F) paclitaxel (0.1– 0.2 μ M). Luego de 48 h, la supervivencia celular fue evaluada a través del ensayo de MTT. Los datos representan la media \pm SD. En los paneles A, B, y C: **p < 0.01 y ***p < 0.001 vs. MCF-7 Tet-Off/ACSL4; (a) ***p < 0.001 tratadas con doxiciclina MCF-7 Tet-Off/ACSL4 vs. MCF-7 Tet-Off/ACSL4. En los paneles D, E y F: *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 vs. MDA-MB-231 *mock*.

4.3 Modulación de la actividad de ACSL4 durante tratamientos con agentes quimioterapéuticos

Se estudió la eficacia de la inhibición de la actividad de ACSL4 en combinación con agentes quimioterapéuticos y su participación en la resistencia celular a la acción de dichos agentes. Se analizó la proliferación de células MDA-MB-231 *wt*, sin modificaciones genéticas, usando concentraciones mínimas de cisplatino, doxorubicina y paclitaxel en combinación con triacsina C, un inhibidor de la actividad de ACSL4 (Askari et al., 2007; Kim, Lewin, & Coleman, 2001; Orlando et al., 2015). Los resultados muestran que ninguno de los quimioterapéuticos ni el tratamiento con triacsina C, de manera individual, afectaron la proliferación celular en cualquiera de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, se observó que la combinación del inhibidor con cisplatino, doxorubicina o paclitaxel (Fig. 3A, B y C, respectivamente) reduce significativamente la inhibición de la proliferación en células MDA-MB-231 *wt*, mostrando notables efectos sinérgicos.

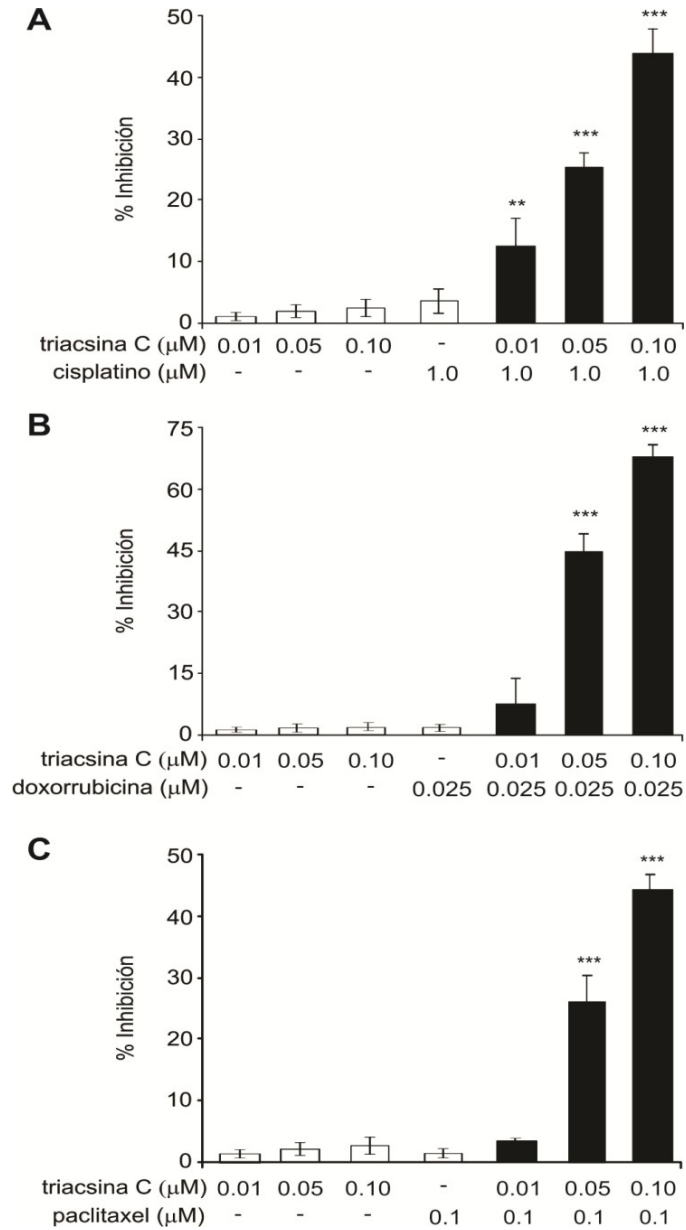


Fig. 3. Efecto de la inhibición de ACSL4 en la proliferación celular, utilizando agentes quimioterapéuticos en células MDA-MB-231 wt. La línea MDA-MB-231 wt fue incubada con A) cisplatino (1.0 μM), B) doxorubicina (0.025 μM), C) paclitaxel (0.1 μM) y triacsina C (0.01– 0.10 μM). Luego de 96 hs, la proliferación celular fue medida con el ensayo de incorporación de BrdU. Los datos representan las medias ± DS. **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. corresponden a los inhibidores actuando individualmente.

4.4 Participación de ACSL4 en la expulsión de compuestos xenobióticos

Debido a que la expulsión de compuestos xenobióticos (por ejemplo: quimioterapéuticos) es uno de los mecanismos asociados a la resistencia a fármacos en células tumorales y la doxorubicina es un compuesto fluorescente ampliamente usado para medir la capacidad de expulsión de diferentes sistemas (Chun, Kwon, Nam, & Kim, 2015; Frankenberg, 2012; Velaei, Samadi, Soltani, Barazvan, & Soleimani Rad, 2017; Yeh, Tsai, & Chen, 2017), se determinó mediante citometría de flujo la capacidad que tienen las diferentes líneas celulares, asociadas a la regulación de la expresión de ACSL4, de retener este compuesto dentro de las células. Después de exponer las células a doxorubicina, se observó un desplazamiento a la derecha en el pico de fluorescencia en las líneas MCF-7 Tet-Off vector vacío, MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y las MDA-MB-231 *mock* tratadas con triacsina C, en comparación con las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* no tratadas. Estos resultados indican un incremento en la acumulación intracelular de doxorubicina cuando la expresión de ACSL4 disminuye (Fig. 4A y B).

Para establecer la participación de transportadores ABC, se realizaron ensayos con el colorante Hoechst 33342 y se analizó la expulsión de este compuesto mediante microscopía de fluorescencia. Se pudo observar que la fluorescencia de Hoechst 33342 era significativamente menor en células MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 (Fig. 4C) y MDA-MB-231 *mock* (Fig. 4D) en comparación a las MCF-7 Tet-Off vector vacío y MDA-MB-231 shRNA ACSL4, lo cual indica una capacidad limitada de las células que sobreexpresan ACSL4 de retener el colorante. Por diversos estudios se sabe que la expulsión de este compuesto está vinculada con la participación de ABCG2 (Scharenberg, Harkey, & Torok-Storb, 2002). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de la activación de ABCG2 en las líneas celulares utilizadas como modelos en este trabajo. Otra manera de evaluar la actividad de los transportadores ABC fue por medio del análisis de expulsión de calceína AM, un sustrato fluorescente de transportadores ABC de la subfamilia C (ABCC) (Feller, Broxterman, Währer, & Pinedo, 1995). Luego del ensayo, se observó un desplazamiento a la derecha en el pico de intensidad de fluorescencia de calceína AM en las MCF-7 Tet-Off vector vacío, MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* en células tratadas con triacsina C, en comparación MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* sin tratar (Fig. 4E y F). Llegados a este punto,

podemos inferir que las células que tienen aumentada la expresión de ACSL4 poseen activados transportadores de la subfamilia ABCC.

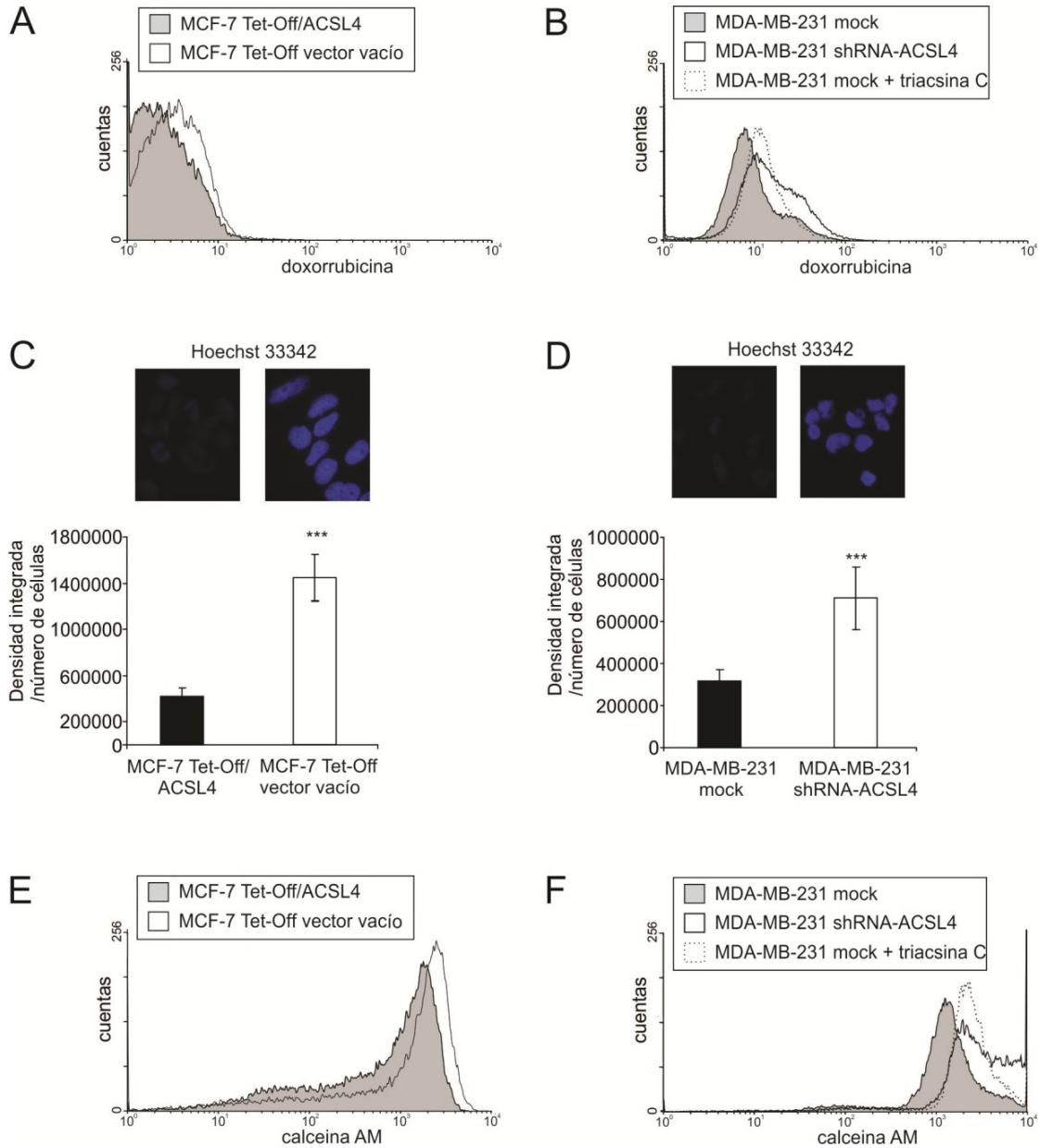


Fig. 4. Implicancia de ACSL4 en la expulsión de compuestos y acumulación intracelular en los modelos celulares MCF-7 Tet-Off y MDA-MB-231 shRNA. Las líneas celulares MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío se trataron con A) doxorubicina (1 μ M), C) Hoechst 33342 (5 μ g / ml) y E) calceína AM (0.5 μ M). Las células MDA-MB-231 *mock* se trataron con B) doxorubicina (1.0 μ M) y triacsina C (1.0 μ M), D) Hoechst 33342 (5 μ g / ml) y F) calceína AM (0.5 μ M) y triacsina C (1.0 μ M). Las MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 se trataron con B) doxorubicina (1.0 μ M), D) Hoechst 33342 (5 μ g / ml) y F) calceína AM (0.5 μ M). La fluorescencia de doxorubicina y calceína AM se analizó mediante citometría de flujo. La fluorescencia de Hoechst 33342 se evaluó mediante microscopía de epifluorescencia. Los datos representan las medias \pm DE. *** $p < 0,001$. El gráfico muestra uno de tres experimentos independientes.

4.5 Efectos de ACSL4 sobre ARNm de transportadores dependiente de energía

Hasta ahora se ha demostrado que las células que sobreexpresan ACSL4 tienen mayor resistencia a tratamientos con drogas quimioterapéuticas y actividad de diferentes transportadores ABC, en comparación con células con baja o nula expresión de la enzima. Dado este contexto, el siguiente paso fue identificar los genes de resistencia a fármacos que responden a ACSL4 en la línea MCF-7 Tet-Off/ ACSL4. Esta identificación se realizó mediante el análisis de secuenciación masiva de ARNm (RNA-seq), previamente realizado en nuestro laboratorio (Castillo et al., 2015). En el análisis transcriptómico se hallaron genes que incluían miembros de la familia de transportadores ABC, los cuales presentaron una expresión significativamente diferencial en la línea MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 comparado con las MCF-7 Tet-Off vector vacío (Tabla 1). De la subfamilia ABC C, los miembros 8 (*ABCC8*) y 4 (*ABCC4*), ambos localizados en la membrana plasmática, fueron las dos proteínas que presentaron *fold change log2* más alto en esta línea celular, 2.95165 y 2.23521, respectivamente. Dentro de la subfamilia ABC G, el miembro 2 (*ABCG2*), localizado en las mitocondrias, núcleo y membrana plasmática arrojó un *fold change log2* de 1.89082. Por lo tanto, los transportadores *ABCC8*, *ABCC4* y *ABCG2* fueron las principales proteínas para analizar (Tabla 1).

| Nombre Gen | Símbolo | Localización | log ₂ fold change |
|---|---------------|---|------------------------------|
| Casete unión a ATP, Sub-Familia C (CFTR/MRP), Miembro 8 | <i>ABCC8</i> | Membrana plasmática | 2.95165 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia C (CFTR/MRP), Miembro 4 | <i>ABCC4</i> | Membrana plasmática | 2.23521 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia G (WHITE), Miembro 2 | <i>ABCG2</i> | Mitocondrias /núcleo membrana plasmática | 1.89082 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia B (MDR/TAP), Miembro 8 | <i>ABCB8</i> | Mitocondrias /núcleo membrana plasmática | 1.87866 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia A (ABC1), Miembro 7 | <i>ABCA7</i> | Membrana plasmática/endosoma/ aparato de golgi | 1.86503 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia A (MDR/TAP), Miembro 10 | <i>ABCB10</i> | Mitocondrias | 1.67862 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia A (ABC1), Miembro 2 | <i>ABCA2</i> | Membrana plasmática/endosoma/ aparato de golgi/ citoesqueleto/ lisosoma/ vacuola | 1.66934 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia F (GCN20), Miembro 2 | <i>ABCF2</i> | Membrana plasmática/ Mitocondrias | 1.66398 |

| | | | |
|---|--------------|--|---------|
| Casete unión a ATP, Sub-Familia B (MDR/TAP), Miembro 7 | <i>ABCB7</i> | Mitocondrias | 1.64724 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia C (CFTR/MRP), Miembro 5 | <i>ABCC5</i> | Membrana plasmática | 1.62059 |
| Casete unión a ATP, Sub-Familia B (MDR/TAP), Miembro 9 | <i>ABCB9</i> | Retículo endoplásmico/lisosoma/ vacuola | 1.60218 |

Tabla 1: Identificación de genes de resistencia a fármacos regulados positivamente por ACSL4 en una línea celular estable de cáncer de mama humano MCF7 Tet-Off/ ACSL4 a través de un análisis transcriptómico. Los datos se muestran como cambios de $\log_2 fold$ en los niveles de expresión génica en las células MCF-7 Tet-Off / ACSL4 en relación con las células del MCF-7 Tet-Off vector vacío.

A partir del análisis transcriptómico, se validó mediante qRT-PCR la expresión diferencial de los genes *ABCC8*, *ABCC4* y *ABCG2*, en las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío. Los resultados mostraron tendencias de expresión génica comparables a lo observado a través de RNA-Seq y además validó la correlación entre estos genes y la expresión de ACSL4 (Fig. 5).

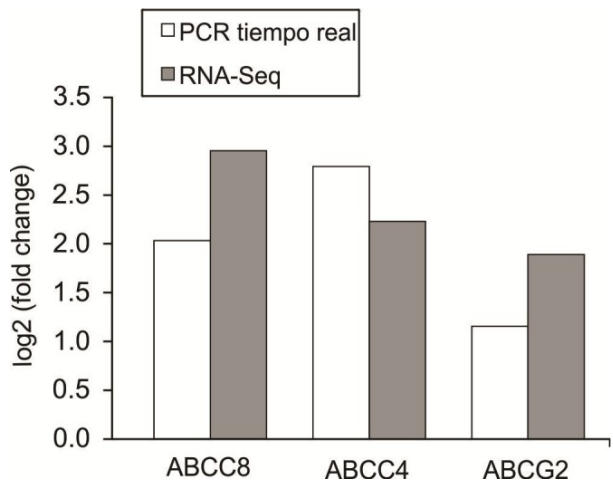


Fig. 5. Expresión de los transportadores ABC en células MCF-7 Tet-Off. Validación de los datos de RNA-Seq mediante la correlación con PCR en tiempo real en MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF-7 Tet-Off vector vacío. Los datos representan proporciones \log_2 de niveles de expresión génica en las células MCF-7 Tet-Off / ACSL4 en relación con las MCF-7 Tet-Off vector vacío. El coeficiente de correlación de rango de Spearman fue de 0.500.

4.6 Efectos de ACSL4 en la expresión de proteínas y regulación de los transportadores dependientes de energía

Luego de haber obtenido los datos de expresión génica de los transportadores ABC, se analizaron los niveles de expresión de proteínas de los tres genes de resistencia vinculados a ACSL4, mediante *western blot* y se midieron los niveles de expresión basal, junto con las modificaciones génicas que regulan los niveles proteicos de ACSL4. Lo primero que se pudo observar es que los niveles de ABCC8, ABCC4 y ABCG2 son significativamente más altos en la línea MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 respecto de las MCF-7 Tet-Off vector vacío y las MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 tratadas con doxiciclina (Fig. 6A). Lo mismo ocurrió en la línea MDA-MB-231 shRNA ACSL4, donde al tener baja expresión de ACSL4, los niveles de expresión de ABCG2, ABCC4 y ABCC8 también se vieron disminuidos en comparación con las MDA-MB-231 *mock* (Fig. 6B). Asimismo, tratando con triacsina C (1.0 μ M), y en consecuencia inhibiendo la actividad endógena de ACSL4 en las células MDA-MB-231*wt*, se pudieron ver resultados muy parecidos a los de MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 (Fig. 6C). En resumen, la inhibición de la actividad o expresión de ACSL4 disminuyó notablemente los niveles de proteína de los transportadores dependientes de energía evaluados.

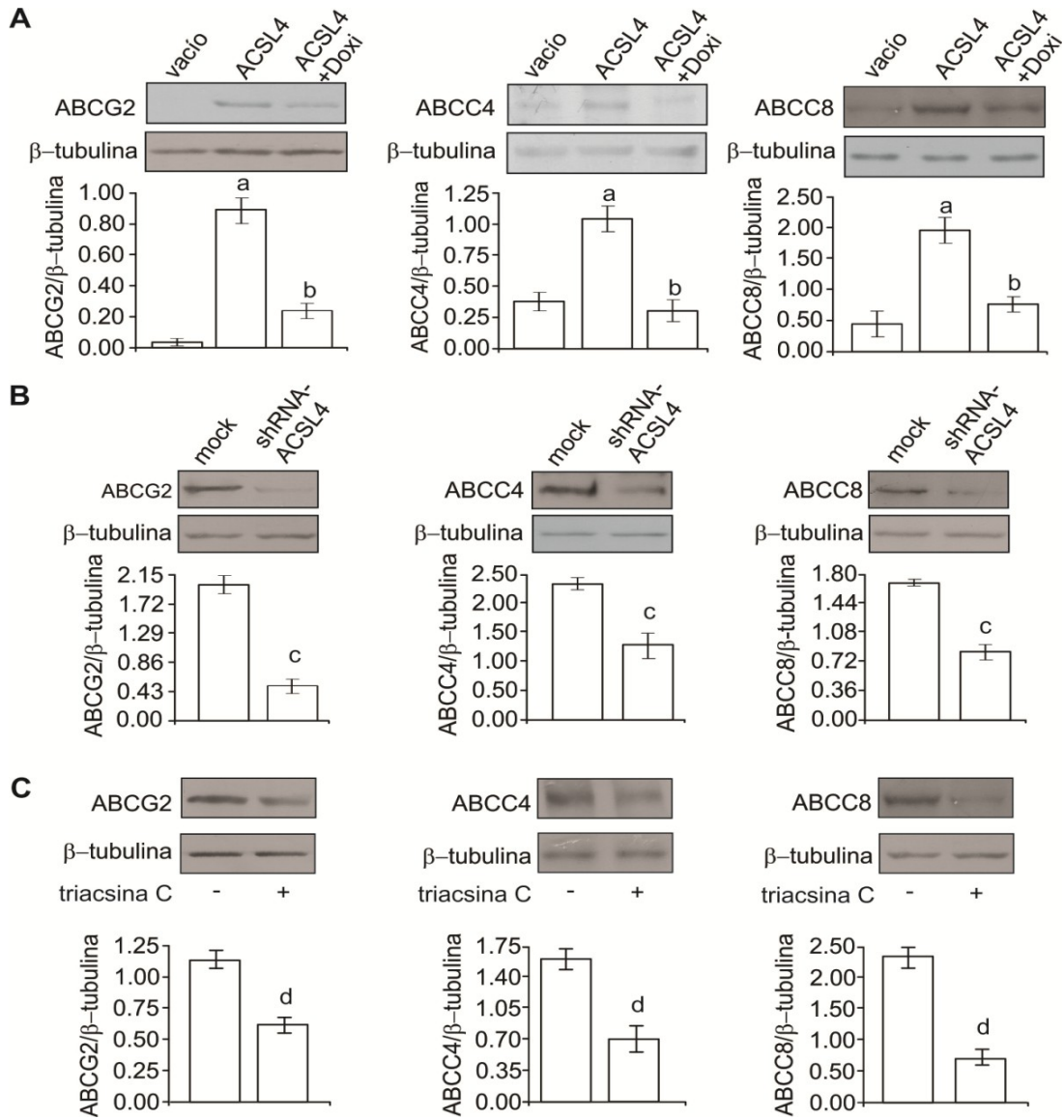


Fig. 6. Efectos de ACSL4 sobre la expresión de proteínas transportadoras resistentes a drogas en los modelos celulares de MCF-7 Tet-Off y MDA-MB-231 shRNA ACSL4. Los extractos celulares se obtuvieron de A) MCF-7 Tet-Off vector vacío, MCF-7 Tet-Off/ACSL4 y MCF-7 Tet-Off/ACSL4 tratadas con doxiciclina (2 µg/ml, 48 hs), B) MDA-MB-231 *mock* y MDA-MB-231 shRNA ACSL4, y C) MDA-MB-231 y MDA-MB-231 tratadas durante 48 hs con triacsina C (1.0 µM). Los niveles de proteínas de ABCG2, ABCC4 y ABCC8 fueron analizados por *western blot* utilizando los anticuerpos indicados. La densidad óptica integrada de los niveles de proteínas se cuantificó y normalizó con la correspondiente señal de β-tubulina. Los datos representan las medias ± D.S de tres experimentos. a: *** p < 0,001 frente a MCF-7 Tet-Off vector vacío; b: *** p < 0,001 vs. células MCF-7 Tet-Off / ACSL4; c: *** p < 0,001 vs. células MDA-MB-231 *mock*; d: *** p < 0,001 vs. células MDA-MB-231 *wt* no tratadas.

Con el fin de analizar más a fondo si el impacto de la expresión de ACSL4, en la viabilidad celular, es mediado por la propia acción efectuada sobre los transportadores ABC, se estudió el efecto de drogas quimioterapéuticas en las líneas: MCF7-Tet-Off/ ACSL4, MCF7 Tet-Off vector vacío, MDA-MB-231 shRNA ACSL4 y MDA-MB-231 *mock*, inhibiendo a ABCG2 con Ko 143 y a ABCC4 con ceefourina 1. Por medio de diferentes estudios, se sabe que estos dos transportadores están asociados a la resistencia a drogas en cáncer (Takenaka et al., 2007). Para este ensayo se utilizaron cisplatino, doxorubicina y paclitaxel con las respectivas concentraciones detalladas en la figura 7. La inhibición de ABCG2 contrarrestó la resistencia celular en las dos líneas que sobreexpresan ACSL4, MCF7 Tet-Off/ ACSL4 (Fig. 7A) y MDA-MB-231 *mock* (Fig. 7B). Estos resultados muestran que las tasas de inhibición de la viabilidad celular son comparables a la de las líneas MCF-7 Tet-Off vector vacío y MDA-MB-231 shRNA-ACSL4, respectivamente. A su vez, la inhibición de ABCC4 recompone la sensibilidad en MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 (Fig. 7A) y MDA-MB-231 *mock* (Fig. 7B), pero solamente cuando éstas fueron tratadas con cisplatino. Respecto a la doxorubicina y a paclitaxel solo se puede observar una reducción parcial del porcentaje de resistencia. Los resultados sugieren una mayor participación de ABCG2 en la resistencia a fármacos mediada por ACSL4. Además, estos hallazgos indican que ACSL4 participa en la resistencia celular a cisplatino, doxorubicina y paclitaxel.

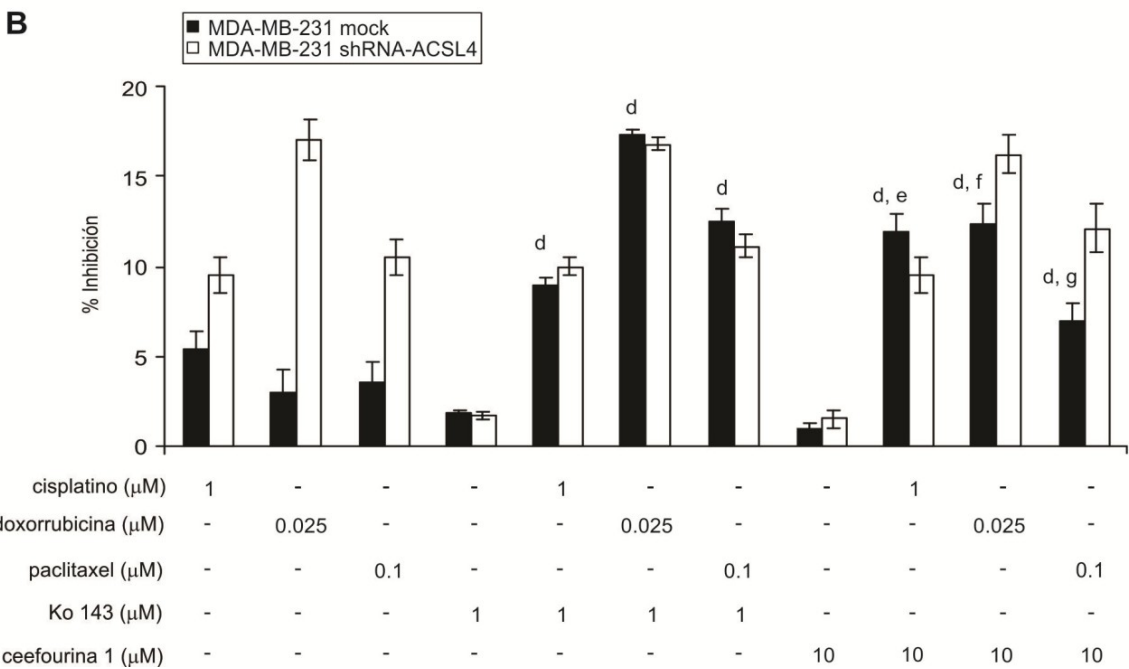
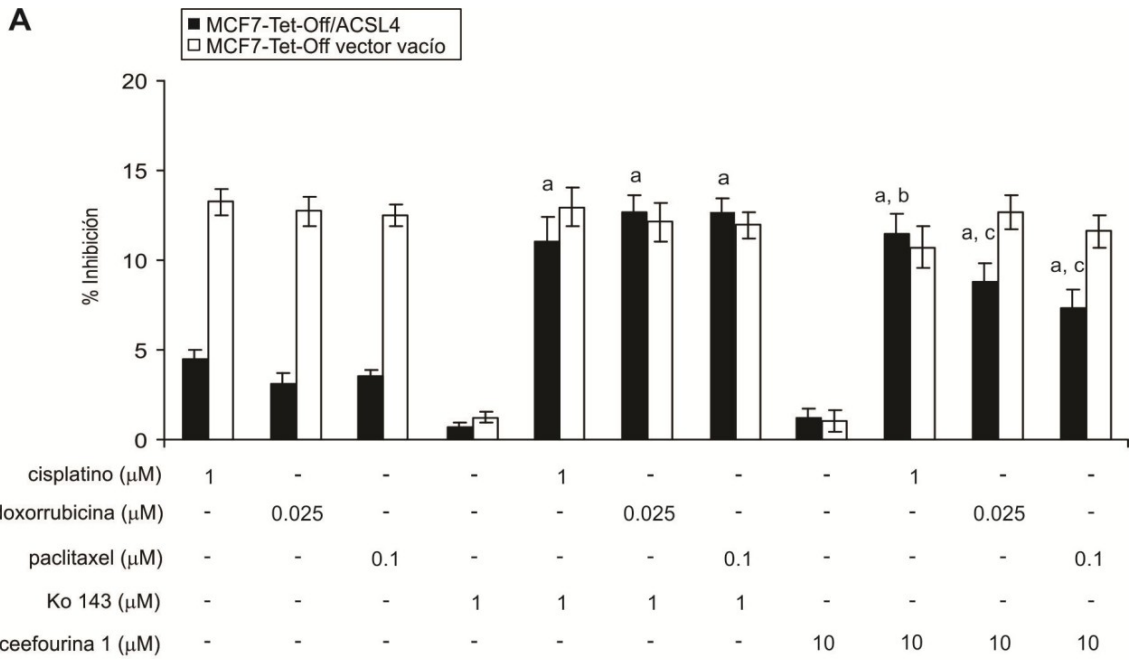


Fig. 7. Impacto de la expresión de ACSL4 e inhibición de los transportadores ABC en la resistencia celular a agentes quimioterapéuticos en las líneas MCF-7 Tet-Off y MDA-MB-231 shRNA ACSL4. A) Las células MCF-7 Tet-Off vector vacío y MCF-7 Tet-Off/ACSL4 y B) MDA-MB-231 *mock* y MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 fueron tratadas con; cisplatino (1.0 μ M), doxorubicina (0.025 μ M), paclitaxel (0.1 μ M), Ko 143 (1 μ M) y ceefourina 1 (10 μ M), en ese orden. Luego de 48 hs, la supervivencia celular fue evaluada por medio del ensayo de MTT. Los datos representan la media \pm DS. a: *** $p < 0.001$ MCF-7 Tet-Off/ACSL4 tratadas con doble droga vs. células tratadas con una droga; b: no significativo y c: ** $p < 0.01$ MCF-7 Tet-Off/ACSL4 tratadas doble vs. MCF-7 Tet-Off vector vacío tratadas doble; d: *** $p < 0.001$ MDA-MB-231 *mock* tratadas doble vs. células tratadas con una sola droga; e: no significativo, f: ** $p < 0.01$, and g: *** $p < 0.001$ MDA-MB-231 *mock* tratadas doble vs. MDA-MB-231 shRNA-ACSL4 tratadas doble.

Con el objetivo de establecer la vía de señalización que media el impacto de la actividad de ACSL4 sobre la resistencia celular a los fármacos quimioterapéuticos, y considerando el trabajo previo de nuestro grupo, donde se muestra una inhibición significativa del crecimiento celular de las MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 tras la inhibición de mTOR y ACSL4 (Orlando et al., 2015), se utilizó un enfoque farmacológico en células MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 que consistió en desafiar las células con concentraciones submáximas de un inhibidor de mTOR, rapamicina (5 nM), y un inhibidor de ACSL4, triacsina C (0.5 μ M), en combinación con cisplatino, doxorubicina y paclitaxel. La combinación de rapamicina, triacsina C y alguno de los 3 fármacos mencionados anteriormente, demostró ser mucho más eficiente para reducir la viabilidad celular, en comparación a la utilización por separado de cada inhibidor o combinando uno de los dos inhibidores con uno de los agentes quimioterapéuticos (Fig. 8A). Cabe destacar que estos ensayos fueron solo realizados en MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF7 Tet-Off vector vacío, ya que estudios anteriores mostraron que las células MDA-MB-231 no responden al tratamiento con rapamicina (Noh et al., 2004).

Por otro lado, a modo de establecer una conexión entre mTOR y ABCG2 mediante la evaluación de la expresión de la proteína ABCG2 en las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MCF7 Tet-Off vector vacío, se utilizó PF4708671 (10 μ M), un inhibidor del ribosoma de la proteína S6 quinasa polipéptido 1 de 70 kDa (p70S6K), la cual tiene un rol clave en la activación de la vía mTOR. Se sabe que ABCG2 está estrechamente asociado a la señalización de mTOR en otras líneas celulares tumorales (Fischer, Frei, Moura, Stahel, & Felley-Bosco, 2012; Goler-Baron, Sladkevich, & Assaraf, 2012; Hu, Huang, Wang, & Gao, 2016; F. F. Huang et al., 2013). Los resultados mostraron una disminución en la expresión de

ABCG2 en las MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 en presencia del inhibidor, pero en la línea MCF-7 Tet-Off vector vacío no se observan variaciones significativas (Fig. 8B). Estos hallazgos indican que ACSL4 participa en la resistencia celular al cisplatino, doxorubicina y paclitaxel, y que esta participación puede ser en parte mediada por su acción sobre ABCG2 a través de la señalización de la vía mTOR.

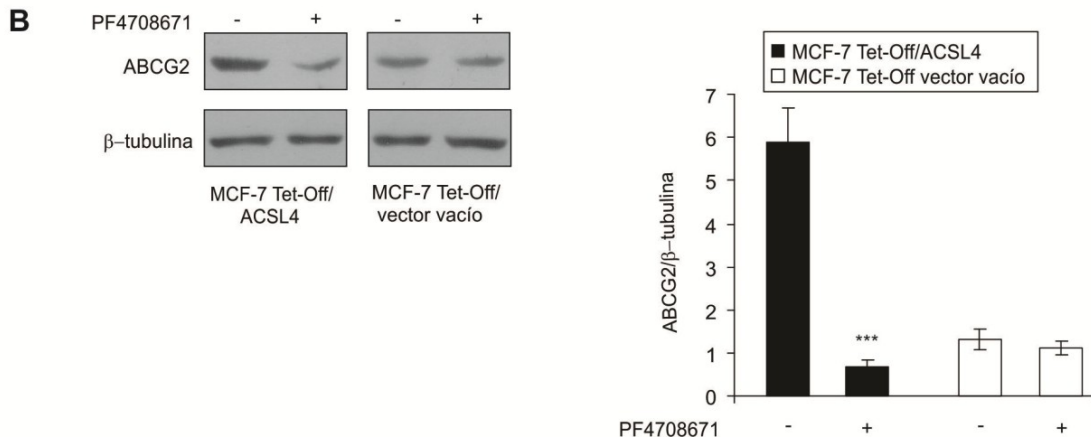
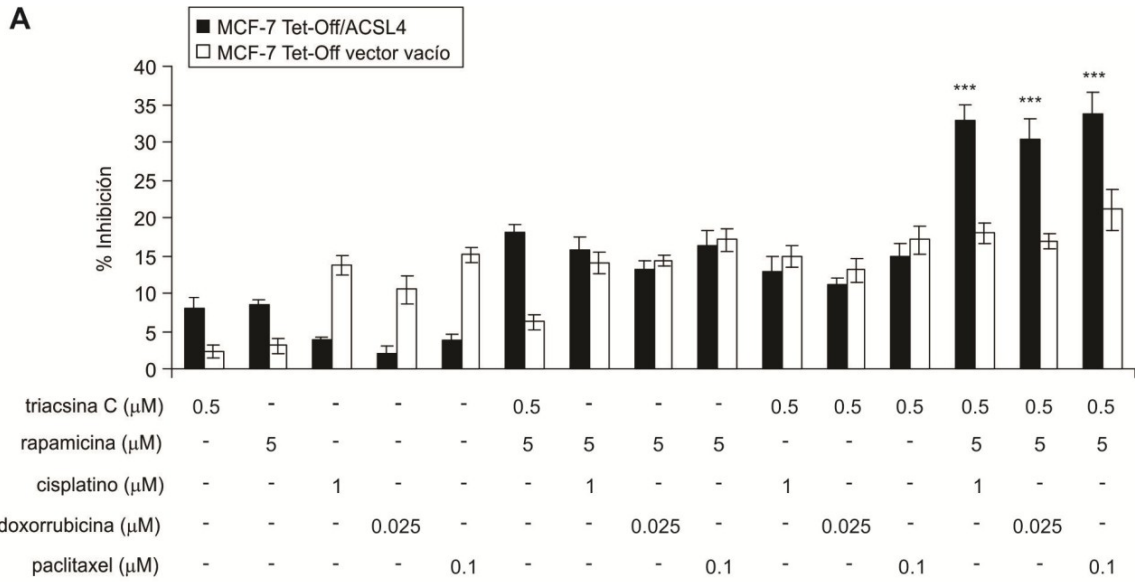


Fig. 8. Vía de señalización que intercede en los efectos de ACSL4 sobre la resistencia celular a agentes quimioterapéuticos en células MCF-7 Tet-Off. A) Las células MCF-7 Tet-Off vector vacío y las MCF-7 Tet-Off/ACSL4 fueron tratadas con cisplatino (1.0 μM), doxorubicina (0.025 μM), paclitaxel (0.1 μM), rapamicina (5 nM) y triacsina C (0.5 μM) o en las combinaciones indicadas. Luego de 48hs, la sobrevivencia celular fue evaluada por medio del ensayo de MTT. *** $p < 0.001$ MCF-7 Tet-Off/ACSL4 tratada con 3 agentes vs. MCF-7 Tet-Off/ACSL4 tratadas con un solo agente o con la combinación de 2. B) Las células MCF-7 Tet-Off vector vacío y MCF-7 Tet-Off/ACSL4 fueron tratadas durante 48 hs con y sin PF4708671 (10 μM), el inhibidor de p70S6K. Los extractos de proteínas fueron analizados por *western blot* utilizando los anticuerpos indicados. La densidad óptica integrada de los niveles de proteínas se cuantificó y normalizó con la correspondiente señal de β -tubulina. Los datos representan las medias \pm D.S de 3 experimentos diferentes e independientes. *** $p < 0.001$ vs. MCF-7 Tet-Off/ACSL4 no tratadas.

5. DISCUSIÓN

Usualmente las terapias para el cáncer suelen combinar dos o más agentes quimioterapéuticos que difieren en términos de acción y mecanismos de resistencia (Wong & Goodin, 2009; Yardley, 2013). En particular, la combinación de fármacos constituye una estrategia terapéutica clave en cáncer de mama triple negativo y otros tipos de cáncer. Esta estrategia intenta bloquear múltiples vías de escape intracelulares esenciales para que el tumor sobreviva. Desafortunadamente, los mecanismos de resistencia a terapias citotóxicas o biológicas pueden dificultar el éxito de los quimioterapéuticos contra el cáncer, especialmente en pacientes cuyas opciones son bastante limitadas (Kalimutho et al., 2015). En este contexto, este trabajo fue llevado a cabo para elucidar la participación de ACSL4 en la resistencia a drogas anti-tumorales y los mecanismos subyacentes.

Los fármacos más utilizados para la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante incluyen antraciclinas, como doxorubicina y epirubicina, taxanos, como paclitaxel y docetaxel, 5-fluorouracilo (5-FU), ciclofosfamida y carboplatino (Yao et al., 2017). Estudios recientes reportaron que la combinación de cisplatino y gemcitabina es la más elegida como estrategia quimioterapéutica de primera línea en pacientes con cáncer de mama triple negativo que presentan metástasis (Hu, X.-C. et al 2015). En base a esto, los fármacos utilizados en este trabajo se encuentran entre los agentes quimioterapéuticos más comunes para tratar tumores de mama, aunque se cree que sus efectos en entornos clínicos son meramente aditivos o, como mucho, apenas sinérgicos (Yardley, 2013).

Anteriormente se describió el desarrollo de una línea celular de cáncer de mama con transfección del gen ACSL4 en forma regulable, las MCF-7 Tet-Off/ ACSL4, que utilizan el sistema de desactivación con tetraciclina, y por otro lado las células MDA-MB-231 shRNA ACSL4 que utilizan el método de silenciamiento génico de ACSL4 mediado por ARN de horquilla corta. En el primer modelo celular, se pudo observar es que la línea MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 muestra niveles significativamente más altos de ARNm y proteína de ACSL4 que su línea control MCF-7 Tet-Off vector vacío, esto se traduce a una mayor tasa de proliferación celular (P. M. Maloberti et al., 2010; Orlando et al., 2012). Además, la regulación de la expresión de ACSL4 con doxiciclina o tetraciclina inhibe significativamente el crecimiento celular y tumoral, lo cual indica que el sistema es completamente funcional en estas líneas (P. M. Maloberti et al., 2010; Orlando et al., 2012). Las líneas MCF-7 Tet-Off/ ACSL4 y MDA-MB-231 *mock* ofrecieron una resistencia más fuerte a los fármacos quimioterapéuticos, que luego se compensó parcialmente cuando se inhibió la expresión y actividad de ACSL4, utilizando doxiciclina, o triacsina C respectivamente. La inhibición de ACSL4 demostró ser eficaz y mejorar la sensibilidad los tres fármacos utilizados, cisplatino, doxorubicina y paclitaxel (Fig. 2 y 3). Interpretando estos resultados se podría pensar que la inhibición de ACSL4 podría fomentar a que en las células tumorales resistentes se desactiven las vías de señalización implicadas en quimiorresistencia y éstas se tornen más sensibles a las drogas antitumorales. Por lo tanto, el bloqueo de ACSL4 en combinación con fármacos quimioterapéuticos podría disminuir significativamente el crecimiento celular y tumoral.

Las células tumorales desarrollan resistencia a los fármacos quimioterapéuticos a través de varios mecanismos y diversas vías de señalización. La adquisición de resistencia puede implicar alteraciones en la distribución del fármaco provocado, generalmente, por la expresión de uno o más transportadores dependientes de energía que sensan y expulsan drogas antitumorales de las células (Gottesman, 2002; Yardley, 2013; Zahreddine & Borden, 2013). Se ha demostrado la relación entre una mayor expresión y actividad del transportador ABC en el crecimiento de tumores de cáncer de mama triple negativo, mientras que su inhibición restablece la sensibilidad celular a los fármacos quimioterapéuticos (Dufour et al., 2015; Iriti et al., 2017; Optical, 2013; Palasuberniam et al., 2015). En este contexto, el aumento de la expulsión de compuestos observado en la figura 4 y el análisis transcriptómico (Tabla 1) apuntan a la participación de los transportadores ABC en la resistencia a fármacos

antitumorales en células que sobreexpresan ACSL4. Los ensayos que se realizaron para este trabajo, revelaron el papel que desempeña ACSL4 como un nuevo regulador de algunos transportadores dependientes de energía, tal como se ve cuando hay sobreexpresión de ACSL4, aumenta la expresión de ABCC8, ABCC4 y ABCG2 (Fig. 5), mientras que la inhibición de su expresión o actividad reduce los niveles de proteínas (Fig. 6). La especificidad de la acción de ACSL4 sobre la expresión de transportadores dependientes de energía se verificó inhibiendo la expresión de ACSL4 por doxiciclina en el modelo MCF-7 Tet-Off/ ACSL4, también mediante la inhibición de la expresión y actividad de ACSL4 en el modelo celular altamente agresivo como lo es MDA-MB- 231 *mock*. Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones de que la sobreexpresión de ACSL4 reduce la sensibilidad celular a los agentes quimioterapéuticos, mientras que la inhibición de ACSL4 la restaura.

Dado que el transportador ABCC8 está fuertemente asociado a la sensibilidad del tratamiento de la diabetes mellitus (Andrikopoulos et al., 2016; Işık et al., 2019; Soiza, Donaldson, & Myint, 2018), pero no se ha relacionado al flujo de fármacos contra el cáncer, los ensayos se centraron en ABCG2 y ABCC4. El transportador ABCG2 no sólo está relacionado con la salida de fármacos quimioterapéuticos, como cisplatino, doxorubicina y paclitaxel (Samanta, Pursell, & Mercurio, 2013; Weijia Zhang et al., 2011; Wenjie Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2015), sino que también con la expulsión de compuestos asociados a procesos fisiológicos (Mao & Unadkat, 2015). Asimismo, este transportador se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama altamente agresivo (Collina et al., 2015; F. F. Huang et al., 2013) y se considera críticamente responsable de la resistencia a los fármacos en las células de mamíferos (Mao & Unadkat, 2015). A su vez, Zhang et al. (2011) ha informado del desarrollo de una línea celular resistente a la quimioterapia a través de la sobreexpresión del receptor de tirosina quinasa 2 Erb-B2 (ERBB2 o HER2) en células MCF-7, con mayor expresión de ABCG2 (Weijia Zhang et al., 2011). Trabajos anteriores de nuestro grupo proporcionan más evidencia, ya que la sobreexpresión de ACSL4 en células MCF-7 produjo un aumento en la expresión de HER2 (Castillo et al., 2015).

En relación a ABCC4, se ha relacionado con la expulsión de cisplatino en diferentes tipos de cáncer (Bagnoli et al., 2013; Y. H. Zhang, Wu, Xiao, Li, & Wang, 2010), pero no presenta efectos sobre el tratamiento con paclitaxel o doxorubicina (Hembruff et al., 2008;

Leidy, 2011). De igual forma, se ha demostrado que ABCC4 promueve la salida de prostaglandina (PGE₂) y contribuye a la metástasis celular triple negativa (Kochel, Reader, Ma, Kundu, & Fulton, 2017), lo que concuerda con informes anteriores de nuestro grupo que muestran la participación de ACSL4 en la sobreexpresión de COX-2 y un aumento en los niveles extracelulares de PGE₂ (P. M. Maloberti et al., 2010).

Los resultados de asociados a las funciones celulares de este trabajo coinciden con la evidencia reportada anteriormente, demostrando que la inhibición de la actividad ABCG2 restaura la sensibilidad al cisplatino, doxorubicina y paclitaxel en las células que sobreexpresan ACSL4. En la misma línea, la inhibición de la actividad ABCC4 logró contrarrestar la resistencia al cisplatino de células que sobreexpresan ACSL4, pero solo contrarrestó parcialmente la resistencia al paclitaxel o la doxorubicina (Fig. 7). Los ensayos funcionales realizados demuestran los efectos de la sobreexpresión de ACSL4 sobre los niveles de ABCG2 y ABCC4, y su impacto sobre la resistencia celular a los fármacos quimioterapéuticos.

En términos de los mecanismos que subyacen a la resistencia celular a los fármacos quimioterapéuticos regulada por ACSL4, la evidencia presentada en este trabajo sugiere que la resistencia dependiente de ACSL4 podría implicar la activación de la vía mTOR. Nuestros resultados actuales muestran que la inhibición de mTOR y la inhibición de ACSL4 funcionan en combinación para aumentar la sensibilidad celular (Fig. 8). Se sabe que ACSL4 regula componentes tanto de mTORC 1 como de 2, junto con sus reguladores y sustratos ascendentes (Orlando et al., 2015). Hallazgos anteriores revelaron un aumento significativo en la fosforilación de p70S6K en Thr389 y su sustrato, la proteína ribosómica S6. También se ha observado un aumento en la fosforilación de Rictor (compañero de mTOR insensible a la rapamicina) en Thr1135, sustrato de p70S6K y componente del complejo mTORC2 (Orlando et al., 2015). Con estos resultados, se puede demostrar que la inhibición de p70S6K produjo una marcada disminución en la expresión de la proteína ABCG2 en células que sobreexpresan ACSL4 (Fig. 8), lo cual va en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente en estudios de cáncer de próstata, que muestran una mayor sensibilidad a la quimioterapia tras la inhibición de p70S6K (Dhar & Basu, 2008; Grünwald et al., 2002). Incluso se ha demostrado que mTOR actúa sobre la localización celular de ABCG2 (Goler-Baron et al., 2012). Por otro lado, la inhibición de la actividad de la glucógeno sintasa quinasa α / β (GSK3 α / β), otro

componente clave regulado por ACSL4 de la señalización de mTOR, aumenta la actividad de mTOR (Orlando et al., 2015), mientras que la inhibición de GSK3 β aumenta la resistencia hormonal y quimioterapéutica en las células de cáncer de mama, efecto que se contrarresta con rapamicina.

6. CONCLUSIÓN

El conjunto de resultados mencionados a lo largo del trabajo, indican que la participación de ACSL4 en el aumento de la resistencia a múltiples fármacos puede implicar la activación de la vía mTOR, aumentando la expresión y actividad de ABCG2, y que inhibiendo su actividad se reduce la quimiorresistencia e inhibición de la proliferación y supervivencia celular, lo cual implica acciones sinérgicas. Siendo así, el tratamiento combinado con concentraciones submáximas de agentes quimioterapéuticos y la inhibición de la actividad de ACSL4 parece ser eficaz para inhibir la proliferación y viabilidad en células que expresan altos niveles de transportadores dependientes de energía. Por estas razones, se puede inferir que la inhibición de ACSL4 en combinación con quimioterapia proporciona una opción de tratamiento eficaz para el cáncer de mama triple negativo altamente metastásico y que puede limitar tanto la toxicidad como los efectos secundarios de las terapias existentes. En otras palabras, el bloqueo de la actividad de ACSL4, junto con el tratamiento quimioterapéutico puede dejar al tumor con muy pocas opciones, evitando el desarrollo de resistencia celular o restaurando la sensibilidad celular a los fármacos en pacientes con mal pronóstico y para los que no se disponen de tratamientos específicos. Como perspectiva futura, existe la esperanza de que una mayor dilucidación de los procesos celulares y moleculares que permiten que las células tumorales desarrollen resistencia y el uso de nuevos agentes para prevenir estos procesos mejorara el resultado de las pacientes con TNBC. En síntesis, la inhibición de ACSL4 tiene un beneficio potencial en aplicaciones terapéuticas en el futuro y también es importante el rol que pudiera tener como biomarcador en la agresividad del cáncer de mama debido a su correlación al cáncer TNBC.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Las perspectivas de futuras investigaciones a partir de los resultados obtenidos en este trabajo podrían orientarse hacia la evaluación del efecto de los quimioterapéuticos sobre la expresión de ACSL4 y de los transportadores dependientes de energía durante tratamientos convencionales, en distintos modelos de líneas tumorales de baja agresividad y expresión basal de ACSL4.

Específicamente, nuestra hipótesis es que la exposición a quimioterapéuticos afectaría positivamente la expresión de ACSL4 y transportadores promoviendo así la agresividad celular y la resistencia a drogas, en líneas tumorales de baja agresividad.

Con el fin de contrastar dicha hipótesis, se evaluaría *in vitro* la exposición prolongada (similar a los tiempos de tratamientos convencionales en la clínica) a agentes quimioterapéuticos en los modelos celulares elegidos. Luego se determinaría la expresión de ACSL4 y de los transportadores, para un posterior análisis funcional asociado a la agresividad celular (proliferación, migración, viabilidad, invasión). Por otro lado, se explorarían las vías señalización asociadas en procesos tumorales, como ser la vía AKT/mTOR o la vía WNT. Además, como sustento de esta hipótesis, realizaríamos análisis *in silico* en bases de datos que contengan muestras de tumores de pacientes.

En este contexto, dado que el aumento de expresión de ACSL4 o transportadores podría ser provocado por la exposición a quimioterapéuticos, sería interesante evaluar la implicancia de las modificaciones epigenéticas como consecuencia de estos tratamientos y su posible impacto funcional.

Las evidencias actuales apoyan fuertemente la necesidad de implementar estrategias para evitar o disminuir la resistencia a drogas quimioterapéuticas. Nuestro desafío constante es aportar conocimientos para el desarrollo o rediseño de protocolos terapéuticos efectivos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. L., Hammerschmidt, M., Miyares, R. L., Stein, C., & Farber, S. A. (2013). *Article Smad Activity and Dorsoventral Patterning in the Zebrafish Embryo*. 5, 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.011>
- Andrikopoulos, S., Fam, B. C., Holdsworth, A., Visinoni, S., Ruan, Z., Stathopoulos, M., ... Morahan, G. (2016). Identification of ABCC8 as a contributory gene to impaired early-phase insulin secretion in NZO mice. *Journal of Endocrinology*, 228(1), 61–73. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0290>
- Asia, S., Asia, S., & Hdi, H. (2020). *Source: Globocan 2020*. 419, 1–2.
- Askari, B., Kanter, J. E., Sherrid, A. M., Golej, D. L., Bender, A. T., Liu, J., ... Bornfeldt, K. E. (2007). Rosiglitazone inhibits Acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor- γ - Independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes*, 56(4), 1143–1152. <https://doi.org/10.2337/db06-0267>
- Bagnoli, M., Beretta, G. L., Gatti, L., Pilotti, S., Alberti, P., Tarantino, E., ... Perego, P. (2013). Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/143202>
- Cao, Y., Dave, K. B., Doan, T. P., & Prescott, S. M. (2001). Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Research*, 61(23), 8429–8434.
- Cao, Yang, Murphy, K. J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2000). Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Letters*, 467(2–3), 263–267. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01159-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01159-5)
- Castillo, A. F., Orlando, U. D., Lopez, P., Solano, A. R., Maloberti, P. M., & Podesta, E. J. (2015). *Transcriptomics : Open Access Gene Expression Profile and Signaling Pathways in MCF-7 Breast Cancer Cells Mediated by Acyl-CoA Synthetase 4 Overexpression*. 3(2). <https://doi.org/10.4172/2329-8936.10001>
- Cheng, J., Fan, Y. Q., Liu, B. H., Zhou, H., Wang, J. M., & Chen, Q. X. (2020). *ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis*. 147–158.

<https://doi.org/10.3892/or.2019.7419>

Chun, S. Y., Kwon, Y. S., Nam, K. S., & Kim, S. (2015). Lapatinib enhances the cytotoxic effects of doxorubicin in MCF-7 tumorspheres by inhibiting the drug efflux function of ABC transporters. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.03.009>

Coleman, R. a, Lewin, T. M., Horn, C. G. Van, & Gonzalez-baro, M. R. (2002). Recent Advances in Nutritional Sciences Synthetases Regulate Fatty Acid Entry into Synthetic Versus Degradative Pathways ? 1 , 2. *Regulation*, (March), 2123–2126.

Collina, F., Di Bonito, M., Li Bergolis, V., De Laurentiis, M., Vitagliano, C., Cerrone, M., ... Botti, G. (2015). Prognostic value of cancer stem cells markers in triple-negative breast cancer. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/158682>

Crapanzano, F., & Balistreri, C. R. (2015). Eicosanoids and cancer. *Eicosanoids, Inflammation and Chronic Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Health Effects and Targets for Therapies*, 10(3), 109–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7841-9_27

Das, S., Mukherjee, P., Chatterjee, R., Jamal, Z., & Chatterji, U. (2019). Enhancing chemosensitivity of breast cancer stem cells by downregulating SOX2 and ABCG2 using wedelolactone-encapsulated nanoparticles. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(3), 680–692. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0409>

Dattilo, M. A., Benzo, Y., Herrera, L. M., Prada, J. G., Castillo, A. F., Orlando, U. D., ... Maloberti, P. M. (2019). Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46776-7>

Dattilo, M. A., Benzo, Y., Herrera, L. M., Prada, J. G., Lopez, P. F., Caruso, C. M., ... Maloberti, P. M. (2020). Regulation and role of Acyl-CoA synthetase 4 in glial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (November), 105792. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105792>

Dhar, R., & Basu, A. (2008). Constitutive activation of p70 S6 kinase is associated with intrinsic resistance to cisplatin. *International Journal of Oncology*, 32(5), 1133–1137. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.5.1133>

Dufour, R., Daumar, P., Mounetou, E., Aubel, C., Kwiatkowski, F., Abrial, C., ... Bamdad, M. (2015). BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: A prospective role in resistance to Olaparib. *Scientific Reports*, 5(June), 1–9.

<https://doi.org/10.1038/srep12670>

- Feller, N., Broxterman, H. J., Währer, D. C. R., & Pinedo, H. M. (1995). ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Letters*, *368*(2), 385–388. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00677-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00677-2)
- Feng, J., Lu, P. zhi, Zhu, G. zhi, Hooi, S. C., Wu, Y., Huang, X. wei, ... Lu, G. dong. (2021). ACSL4 is a predictive biomarker of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, *42*(1), 160–170. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0439-x>
- Fischer, B., Frei, C., Moura, U., Stahel, R., & Felley-Bosco, E. (2012). Inhibition of phosphoinositide-3 kinase pathway down regulates ABCG2 function and sensitizes malignant pleural mesothelioma to chemotherapy. *Lung Cancer*, *78*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.07.005>
- Frankenberg, E. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.041>.Breast
- Golej, D. L., Askari, B., Kramer, F., Barnhart, S., Vivekanandan-giri, A., Pennathur, S., & Bornfeldt, K. E. (2011). *prostaglandin E 2 release from human arterial smooth muscle cells*. 52. <https://doi.org/10.1194/jlr.M013292>
- Goler-Baron, V., Sladkevich, I., & Assaraf, Y. G. (2012). Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *83*(10), 1340–1348. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.033>
- Gottesman, M. M. (2002). *Gottesman 2002 ABC transporters*.
- Grünwald, V., DeGraffenried, L., Russel, D., Friedrichs, W. E., Ray, R. B., & Hidalgo, M. (2002). Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Research*, *62*(21), 6141–6145.
- Harizi, H., Corcuff, J. B., & Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, *14*(10), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.08.005>
- Hembruff, S. L., Laberge, M. L., Villeneuve, D. J., Guo, B., Veitch, Z., Cecchetto, M., & Parissenti, A. M. (2008). Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of

- drug resistance. *BMC Cancer*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-318>
- Hu, C. F., Huang, Y. Y., Wang, Y. J., & Gao, F. G. (2016). Upregulation of ABCG2 via the PI3K-Akt pathway contributes to acidic microenvironment-induced cisplatin resistance in A549 and LTP-a-2 lung cancer cells. *Oncology Reports*, 36(1), 455–461. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4827>
- Huang, F. F., Wu, D. S., Zhang, L., Yu, Y. H., Yuan, X. Y., Li, W. J., ... Zeng, H. (2013). Inactivation of PTEN increases ABCG2 expression and the side population through the PI3K/Akt pathway in adult acute leukemia. *Cancer Letters*, 336(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.006>
- Huang, H., Li, J., Shen, J., Lin, L., Wu, X., Xiang, S., ... Xiao, Z. (2020). Increased ABCC4 Expression Induced by ER α Leads to Docetaxel Resistance via Efflux of Docetaxel in Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01474>
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabała-Dzik, A., ... Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529–1538. <https://doi.org/10.1002/ptr.5878>
- Işık, E., Demirbilek, H., Houghton, J. A., Ellard, S., Flanagan, S. E., & Hussain, K. (2019). Congenital hyperinsulinism and evolution to sulfonylurea-responsive diabetes later in life due to a novel homozygous p.L171F ABCC8 mutation. *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2018.2018.0077>
- Kalimutho, M., Parsons, K., Mittal, D., López, J. A., Srihari, S., & Khanna, K. K. (2015). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(12), 822–846. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.009>
- Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., ... Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2880–2884. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2880>
- Kim, J. H., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2001). Expression and characterization of recombinant rat acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5: Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24667–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010793200>
- Kochel, T. J., Reader, J. C., Ma, X., Kundu, N., & Fulton, A. M. (2017). Multiple drug resistance-

- associated protein (MRP4) exports prostaglandin E2 (PGE2) and contributes to metastasis in basal/ triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(4), 6540–6554.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14145>
- Kong, J. N., He, Q., Wang, G., Dasgupta, S., Dinkins, M. B., Zhu, G., ... Bieberich, E. (2015). Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells. *International Journal of Cancer*, 137(7), 1610–1620. <https://doi.org/10.1002/ijc.29542>
- Kuwata, H., & Hara, S. (2019). Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 144(July), 106363.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106363>
- Leidy. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.023>.Sensitization
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang, Huang, Z. jian, Lin, Z. tao, Mao, N., ... Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., ... Chen, Z. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance : Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*, 27, 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.05.001>
- Lim, J. S., Jung, G. Y., & Park, S. Y. (2019). Nkx-2.5 regulates MDR1 expression via its upstream promoter in breast cancer cells. *Journal of Korean Medical Science*, 34(12), 1–12.
<https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e100>
- Liu, Z., Huang, Y., Zhang, Y., Chen, D., & Zhang, Y. Q. (2011). *Drosophila Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4 Regulates Axonal Transport of Synaptic Vesicles and Is Required for Synaptic Development and Transmission*. 31(6), 2052–2063.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3278-10.2011>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). *Mammary gland development*. 1(August), 533–557.
<https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Maloberti, P., Castilla, R., Castillo, F., Maciel, F. C., Mendez, C. F., Paz, C., & Podestá, E. J. (2005). Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS Journal*, 272(7), 1804–1814.

<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04616.x>

- Maloberti, P., Lozano, R. C., Mele, P. G., Cano, F., Colonna, C., Mendez, C. F., ... Podestá, E. J. (2002). Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5599–5607. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03267.x>
- Maloberti, P. M., Duarte, A. B., Orlando, U. D., Pasqualini, M. E., Solano, A. R., Lopez-Otín, C., & Podesta, E. J. (2010). Functional interaction between acyl-coa synthetase 4, lipooxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015540>
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2005). Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS Journal*, 7(1), 118–133. <https://doi.org/10.1208/aapsj070112>
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2015). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS Journal*, 17(1), 65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
- Monaco, M. E., Creighton, C. J., Lee, P., Zou, X., Topham, M. K., & Stafforini, D. M. (2010). Expression of long-chain fatty Acyl-CoA synthetase 4 in breast and prostate cancers is associated with sex steroid hormone receptor negativity. *Translational Oncology*, 3(2), 91–98. <https://doi.org/10.1593/tlo.09202>
- Ndiaye, H., Liu, J. Y., Hall, A., Minogue, S., Morgan, M. Y., & Waugh, M. G. (2020). Immunohistochemical staining reveals differential expression of ACSL3 and ACSL4 in hepatocellular carcinoma and hepatic gastrointestinal metastases. *Bioscience Reports*, 40(4), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BSR20200219>
- Noh, W. C., Mondesire, W. H., Peng, J., Jian, W., Zhang, H., Dong, J. J., ... Meric-Bernstam, F. (2004). Determinants of Rapamycin Sensitivity in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 1013–1023. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0043>
- Optical, B. (2013). *r Fo Pe er Re vi r Fo Pe Re vi*.
- Orlando, U. D., Castillo, A. F., Dattilo, M. A., Solano, A. R., Maloberti, P. M., & Podesta, E. J. (2015). *Acyl-CoA synthetase-4, a new regulator of mTOR and a potential therapeutic target for enhanced estrogen receptor function in receptor-positive and-negative breast cancer* (Vol. 6). Retrieved from www.impactjournals.com/oncotarget

- Orlando, U. D., Garona, J., Ripoll, G. V., Maloberti, P. M., Solano, Á. R., Avagnina, A., ... Podestá, E. J. (2012). The functional interaction between acyl-coa synthetase 4, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: A novel therapeutic target. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040794>
- Palasuberniam, P., Yang, X., Kraus, D., Jones, P., Myers, K. A., & Chen, B. (2015). ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Scientific Reports*, 5(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep13298>
- Piccini, M., Vitelli, F., Bruttini, M., Pober, B. R., Jonsson, J. J., Villanova, M., ... Renieri, A. (1998). *FACLA*, a New Gene Encoding Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4, Is Deleted in a Family with Alport Syndrome, Elliptocytosis, and Mental Retardation. 358(47), 350–358.
- Registry, C. C., & Cancer, S. F. (2021). *GLOBOCAN BREAST CANCER 2020. 024*, 2020–2021.
- Samanta, S., Pursell, B., & Mercurio, A. M. (2013). IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12569–12573. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.442319>
- Sánchez-Martínez, R., Cruz-Gil, S., García-Álvarez, M. S., Reglero, G., & De Molina, A. R. (2017). Complementary ACSL isoforms contribute to a non-Warburg advantageous energetic status characterizing invasive colon cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11612-3>
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507–512. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.2.507>
- Soiza, R. L., Donaldson, A. I. C., & Myint, P. K. (2018). Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), 259–261. <https://doi.org/10.1177/https>
- Sung, Y. K., Hwang, S. Y., Park, M. K., Bae, H. I., Kim, W. H., Kim, J. C., & Kim, M. (2003). Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 94(5), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01458.x>
- Takegawa, N., Nonagase, Y., Yonesaka, K., Sakai, K., Maenishi, O., Ogitani, Y., ... Tsurutani, J. (2017). DS-8201a, a new HER2-targeting antibody–drug conjugate incorporating a novel DNA topoisomerase I inhibitor, overcomes HER2-positive gastric cancer T-DM1 resistance.

- International Journal of Cancer*, 141(8), 1682–1689. <https://doi.org/10.1002/ijc.30870>
- Takenaka, K., Morgan, J. A., Scheffer, G. L., Adachi, M., Stewart, C. F., Sun, D., ... Schuetz, J. D. (2007). Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Research*, 67(14), 6965–6972. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4720>
- Velaei, K., Samadi, N., Soltani, S., Barazvan, B., & Soleimani Rad, J. (2017). NFκBP65 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>
- Wong, S. T., & Goodin, S. (2009). Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy*, 29(8), 954–965. <https://doi.org/10.1592/phco.29.8.954>
- Wu, X., Deng, F., Li, Y., Daniels, G., Du, X., Ren, Q., ... Lee, P. (2015). ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget*, 6(42), 44849–44863. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6438>
- Wu, X., Li, Y., Wang, J., Wen, X., Marcus, M. T., Daniels, G., ... Monaco, M. E. (2013). Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 Is a Biomarker for and Mediator of Hormone Resistance in Human Breast Cancer. *PLoS ONE*, 8(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077060>
- Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X. (2017). Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*, 8(1), 1913–1924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12284>
- Yardley, D. A. (2013). Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. *International Journal of Breast Cancer*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/137414>
- Yeh, W. L., Tsai, C. F., & Chen, D. R. (2017). Peri-foci adipose-derived stem cells promote chemoresistance in breast cancer. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0630-2>
- Yeo, S. K., & Guan, J. (2018). *Breast cancer subtypes*. 3(11), 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.001.Breast>
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4 MAR(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>

- Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., & Sun, C. (2015). Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology Reports*, *33*(3), 1147–1154. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3702>
- Zhang, Weijia, Ding, W., Chen, Y., Feng, M., Ouyang, Y., Yu, Y., & He, Z. (2011). Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *43*(8), 647–653. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr050>
- Zhang, Wenjie, Yu, F., Wang, Y., Zhang, Y., Meng, L., & Chi, Y. (2018). Rab23 promotes the cisplatin resistance of ovarian cancer via the Shh-Gli-ABCG2 signaling pathway. *Oncology Letters*, *15*(4), 5155–5160. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7949>
- Zhang, Y. H., Wu, Q., Xiao, X. Y., Li, D. W., & Wang, X. P. (2010). Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Letters*, *291*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.10.003>
- Zhou, Q., Ye, M., Lu, Y., Zhang, H., Chen, Q., Huang, S., & Su, S. (2015). Curcumin improves the tumoricidal effect of mitomycin C by suppressing ABCG2 expression in stem cell-like breast cancer cells. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136694>
- Anderson, J. L., Hammerschmidt, M., Miyares, R. L., Stein, C., & Farber, S. A. (2013). *Article Smad Activity and Dorsoventral Patterning in the Zebrafish Embryo*. *5*, 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.011>
- Andrikopoulos, S., Fam, B. C., Holdsworth, A., Visinoni, S., Ruan, Z., Stathopoulos, M., ... Morahan, G. (2016). Identification of ABCC8 as a contributory gene to impaired early-phase insulin secretion in NZO mice. *Journal of Endocrinology*, *228*(1), 61–73. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0290>
- Asia, S., Asia, S., & Hdi, H. (2020). *Source: Globocan 2020*. *419*, 1–2.
- Askari, B., Kanter, J. E., Sherrid, A. M., Golej, D. L., Bender, A. T., Liu, J., ... Bornfeldt, K. E. (2007). Rosiglitazone inhibits Acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor- γ - Independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes*, *56*(4), 1143–1152. <https://doi.org/10.2337/db06-0267>
- Bagnoli, M., Beretta, G. L., Gatti, L., Pilotti, S., Alberti, P., Tarantino, E., ... Perego, P. (2013). Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. *BioMed Research International*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/143202>

- Cao, Y., Dave, K. B., Doan, T. P., & Prescott, S. M. (2001). Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Research*, *61*(23), 8429–8434.
- Cao, Yang, Murphy, K. J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2000). Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Letters*, *467*(2–3), 263–267.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01159-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01159-5)
- Castillo, A. F., Orlando, U. D., Lopez, P., Solano, A. R., Maloberti, P. M., & Podesta, E. J. (2015). *Transcriptomics : Open Access Gene Expression Profile and Signaling Pathways in MCF-7 Breast Cancer Cells Mediated by Acyl-CoA Synthetase 4 Overexpression*. *3*(2). <https://doi.org/10.4172/2329-8936.10001>
- Cheng, J., Fan, Y. Q., Liu, B. H., Zhou, H., Wang, J. M., & Chen, Q. X. (2020). *ACSL4 suppresses glioma cells proliferation via activating ferroptosis*. 147–158. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7419>
- Chun, S. Y., Kwon, Y. S., Nam, K. S., & Kim, S. (2015). Lapatinib enhances the cytotoxic effects of doxorubicin in MCF-7 tumorspheres by inhibiting the drug efflux function of ABC transporters. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *72*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.03.009>
- Coleman, R. a, Lewin, T. M., Horn, C. G. Van, & Gonzalez-baro, M. R. (2002). Recent Advances in Nutritional Sciences Synthetases Regulate Fatty Acid Entry into Synthetic Versus Degradative Pathways ? 1 , 2. *Regulation*, (March), 2123–2126.
- Collina, F., Di Bonito, M., Li Bergolis, V., De Laurentiis, M., Vitagliano, C., Cerrone, M., ... Botti, G. (2015). Prognostic value of cancer stem cells markers in triple-negative breast cancer. *BioMed Research International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/158682>
- Crapanzano, F., & Balistreri, C. R. (2015). Eicosanoids and cancer. *Eicosanoids, Inflammation and Chronic Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Health Effects and Targets for Therapies*, *10*(3), 109–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7841-9_27
- Das, S., Mukherjee, P., Chatterjee, R., Jamal, Z., & Chatterji, U. (2019). Enhancing chemosensitivity of breast cancer stem cells by downregulating SOX2 and ABCG2 using wedelolactone-encapsulated nanoparticles. *Molecular Cancer Therapeutics*, *18*(3), 680–692. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0409>
- Dattilo, M. A., Benzo, Y., Herrera, L. M., Prada, J. G., Castillo, A. F., Orlando, U. D., ... Maloberti, P. M. (2019). Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46776-7>
- Dattilo, M. A., Benzo, Y., Herrera, L. M., Prada, J. G., Lopez, P. F., Caruso, C. M., ... Maloberti, P. M. (2020). Regulation and role of Acyl-CoA synthetase 4 in glial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (November), 105792. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105792>
- Dhar, R., & Basu, A. (2008). Constitutive activation of p70 S6 kinase is associated with intrinsic resistance to

- cisplatin. *International Journal of Oncology*, 32(5), 1133–1137. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.5.1133>
- Dufour, R., Daumar, P., Mounetou, E., Aubel, C., Kwiatkowski, F., Abrial, C., ... Bamdad, M. (2015). BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: A prospective role in resistance to Olaparib. *Scientific Reports*, 5(June), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep12670>
- Feller, N., Broxterman, H. J., Währer, D. C. R., & Pinedo, H. M. (1995). ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Letters*, 368(2), 385–388. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00677-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00677-2)
- Feng, J., Lu, P. zhi, Zhu, G. zhi, Hooi, S. C., Wu, Y., Huang, X. wei, ... Lu, G. dong. (2021). ACSL4 is a predictive biomarker of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(1), 160–170. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0439-x>
- Fischer, B., Frei, C., Moura, U., Stahel, R., & Felley-Bosco, E. (2012). Inhibition of phosphoinositide-3 kinase pathway down regulates ABCG2 function and sensitizes malignant pleural mesothelioma to chemotherapy. *Lung Cancer*, 78(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.07.005>
- Frankenberg, E. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.041>. Breast
- Golej, D. L., Askari, B., Kramer, F., Barnhart, S., Vivekanandan-giri, A., Pennathur, S., & Bornfeldt, K. E. (2011). prostaglandin E 2 release from human arterial smooth muscle cells. 52. <https://doi.org/10.1194/jlr.M013292>
- Goler-Baron, V., Sladkevich, I., & Assaraf, Y. G. (2012). Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 83(10), 1340–1348. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.033>
- Gottesman, M. M. (2002). *Gottesman 2002 ABC transporters*.
- Grünwald, V., DeGraffenried, L., Russel, D., Friedrichs, W. E., Ray, R. B., & Hidalgo, M. (2002). Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 62(21), 6141–6145.
- Harizi, H., Corcuff, J. B., & Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, 14(10), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.08.005>
- Hembruff, S. L., Laberge, M. L., Villeneuve, D. J., Guo, B., Veitch, Z., Cecchetto, M., & Parissenti, A. M. (2008). Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-318>

- Hu, C. F., Huang, Y. Y., Wang, Y. J., & Gao, F. G. (2016). Upregulation of ABCG2 via the PI3K-Akt pathway contributes to acidic microenvironment-induced cisplatin resistance in A549 and LTEP-a-2 lung cancer cells. *Oncology Reports*, 36(1), 455–461. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4827>
- Huang, F. F., Wu, D. S., Zhang, L., Yu, Y. H., Yuan, X. Y., Li, W. J., ... Zeng, H. (2013). Inactivation of PTEN increases ABCG2 expression and the side population through the PI3K/Akt pathway in adult acute leukemia. *Cancer Letters*, 336(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.006>
- Huang, H., Li, J., Shen, J., Lin, L., Wu, X., Xiang, S., ... Xiao, Z. (2020). Increased ABCC4 Expression Induced by ERRA Leads to Docetaxel Resistance via Efflux of Docetaxel in Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01474>
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabała-Dzik, A., ... Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529–1538. <https://doi.org/10.1002/ptr.5878>
- Işık, E., Demirbilek, H., Houghton, J. A., Ellard, S., Flanagan, S. E., & Hussain, K. (2019). Congenital hyperinsulinism and evolution to sulfonylurea-responsive diabetes later in life due to a novel homozygous p.L171F ABCC8 mutation. *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2018.2018.0077>
- Kalimutho, M., Parsons, K., Mittal, D., López, J. A., Srihari, S., & Khanna, K. K. (2015). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(12), 822–846. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.009>
- Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., ... Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2880–2884. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2880>
- Kim, J. H., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2001). Expression and characterization of recombinant rat acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5: Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24667–24673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010793200>
- Kochel, T. J., Reader, J. C., Ma, X., Kundu, N., & Fulton, A. M. (2017). Multiple drug resistance-associated protein (MRP4) exports prostaglandin E2 (PGE2) and contributes to metastasis in basal/ triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(4), 6540–6554. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14145>
- Kong, J. N., He, Q., Wang, G., Dasgupta, S., Dinkins, M. B., Zhu, G., ... Bieberich, E. (2015). Guggulsterone and bexarotene induce secretion of exosome-associated breast cancer resistance protein and reduce doxorubicin resistance in MDA-MB-231 cells. *International Journal of Cancer*, 137(7), 1610–1620. <https://doi.org/10.1002/ijc.29542>

- Kuwata, H., & Hara, S. (2019). Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 144(July), 106363. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106363>
- Leidy. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.023>. Sensitization
- Li, J., Cao, F., Yin, H. liang, Huang, Z. jian, Lin, Z. tao, Mao, N., ... Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., ... Chen, Z. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance : Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*, 27, 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.05.001>
- Lim, J. S., Jung, G. Y., & Park, S. Y. (2019). Nkx-2.5 regulates MDR1 expression via its upstream promoter in breast cancer cells. *Journal of Korean Medical Science*, 34(12), 1–12. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e100>
- Liu, Z., Huang, Y., Zhang, Y., Chen, D., & Zhang, Y. Q. (2011). *Drosophila Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4 Regulates Axonal Transport of Synaptic Vesicles and Is Required for Synaptic Development and Transmission*. 31(6), 2052–2063. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3278-10.2011>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). *Mammary gland development*. 1(August), 533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Maloberti, P., Castilla, R., Castillo, F., Maciel, F. C., Mendez, C. F., Paz, C., & Podestá, E. J. (2005). Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS Journal*, 272(7), 1804–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04616.x>
- Maloberti, P., Lozano, R. C., Mele, P. G., Cano, F., Colonna, C., Mendez, C. F., ... Podestá, E. J. (2002). Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5599–5607. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03267.x>
- Maloberti, P. M., Duarte, A. B., Orlando, U. D., Pasqualini, M. E., Solano, A. R., Lopez-Otín, C., & Podesta, E. J. (2010). Functional interaction between acyl-coa synthetase 4, lipooxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015540>
- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2005). Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS Journal*, 7(1), 118–133. <https://doi.org/10.1208/aapsj070112>

- Mao, Q., & Unadkat, J. D. (2015). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS Journal*, 17(1), 65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
- Monaco, M. E., Creighton, C. J., Lee, P., Zou, X., Topham, M. K., & Stafforini, D. M. (2010). Expression of long-chain fatty Acyl-CoA synthetase 4 in breast and prostate cancers is associated with sex steroid hormone receptor negativity. *Translational Oncology*, 3(2), 91–98. <https://doi.org/10.1593/tlo.09202>
- Ndiaye, H., Liu, J. Y., Hall, A., Minogue, S., Morgan, M. Y., & Waugh, M. G. (2020). Immunohistochemical staining reveals differential expression of ACSL3 and ACSL4 in hepatocellular carcinoma and hepatic gastrointestinal metastases. *Bioscience Reports*, 40(4), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BSR20200219>
- Noh, W. C., Mondesire, W. H., Peng, J., Jian, W., Zhang, H., Dong, J. J., ... Meric-Bernstam, F. (2004). Determinants of Rapamycin Sensitivity in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 1013–1023. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0043>
- Optical, B. (2013). *r Fo Pe er Re vi r Fo Pe Re vi*.
- Orlando, U. D., Castillo, A. F., Dattilo, M. A., Solano, A. R., Maloberti, P. M., & Podesta, E. J. (2015). *Acyl-CoA synthetase-4, a new regulator of mTOR and a potential therapeutic target for enhanced estrogen receptor function in receptor-positive and-negative breast cancer* (Vol. 6). Retrieved from www.impactjournals.com/oncotarget
- Orlando, U. D., Garona, J., Ripoll, G. V., Maloberti, P. M., Solano, Á. R., Avagnina, A., ... Podestá, E. J. (2012). The functional interaction between acyl-coa synthetase 4, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: A novel therapeutic target. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040794>
- Palasuberniam, P., Yang, X., Kraus, D., Jones, P., Myers, K. A., & Chen, B. (2015). ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Scientific Reports*, 5(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep13298>
- Piccini, M., Vitelli, F., Bruttini, M., Pober, B. R., Jonsson, J. J., Villanova, M., ... Renieri, A. (1998). *FACL4, a New Gene Encoding Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4, Is Deleted in a Family with Alport Syndrome, Elliptocytosis, and Mental Retardation*. 358(47), 350–358.
- Registry, C. C., & Cancer, S. F. (2021). *GLOBOCAN BREAST CANCER 2020. 024*, 2020–2021.
- Samanta, S., Pursell, B., & Mercurio, A. M. (2013). IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12569–12573. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.442319>
- Sánchez-Martínez, R., Cruz-Gil, S., García-Álvarez, M. S., Reglero, G., & De Molina, A. R. (2017). Complementary ACSL isoforms contribute to a non-Warburg advantageous energetic status characterizing

- invasive colon cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11612-3>
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507–512. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.2.507>
- Soiza, R. L., Donaldson, A. I. C., & Myint, P. K. (2018). Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), 259–261. <https://doi.org/10.1177/https>
- Sung, Y. K., Hwang, S. Y., Park, M. K., Bae, H. I., Kim, W. H., Kim, J. C., & Kim, M. (2003). Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 94(5), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01458.x>
- Takegawa, N., Nonagase, Y., Yonesaka, K., Sakai, K., Maenishi, O., Ogitani, Y., ... Tsurutani, J. (2017). DS-8201a, a new HER2-targeting antibody–drug conjugate incorporating a novel DNA topoisomerase I inhibitor, overcomes HER2-positive gastric cancer T-DM1 resistance. *International Journal of Cancer*, 141(8), 1682–1689. <https://doi.org/10.1002/ijc.30870>
- Takenaka, K., Morgan, J. A., Scheffer, G. L., Adachi, M., Stewart, C. F., Sun, D., ... Schuetz, J. D. (2007). Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Research*, 67(14), 6965–6972. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4720>
- Velaei, K., Samadi, N., Soltani, S., Barazvan, B., & Soleimani Rad, J. (2017). NFκBP65 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>
- Wong, S. T., & Goodin, S. (2009). Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy*, 29(8), 954–965. <https://doi.org/10.1592/phco.29.8.954>
- Wu, X., Deng, F., Li, Y., Daniels, G., Du, X., Ren, Q., ... Lee, P. (2015). ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget*, 6(42), 44849–44863. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6438>
- Wu, X., Li, Y., Wang, J., Wen, X., Marcus, M. T., Daniels, G., ... Monaco, M. E. (2013). Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 Is a Biomarker for and Mediator of Hormone Resistance in Human Breast Cancer. *PLoS ONE*, 8(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077060>
- Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X. (2017). Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*, 8(1), 1913–1924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12284>
- Yardley, D. A. (2013). Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. *International Journal of Breast Cancer*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/137414>

- Yeh, W. L., Tsai, C. F., & Chen, D. R. (2017). Peri-foci adipose-derived stem cells promote chemoresistance in breast cancer. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0630-2>
- Yeo, S. K., & Guan, J. (2018). *Breast cancer subtypes*. 3(11), 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.001>. Breast
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4 MAR(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>
- Zhang, G., Wang, Z., Qian, F., Zhao, C., & Sun, C. (2015). Silencing of the ABCG4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 33(3), 1147–1154. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3702>
- Zhang, Weijia, Ding, W., Chen, Y., Feng, M., Ouyang, Y., Yu, Y., & He, Z. (2011). Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(8), 647–653. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr050>
- Zhang, Wenjie, Yu, F., Wang, Y., Zhang, Y., Meng, L., & Chi, Y. (2018). Rab23 promotes the cisplatin resistance of ovarian cancer via the Shh-Gli-ABCG2 signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(4), 5155–5160. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7949>
- Zhang, Y. H., Wu, Q., Xiao, X. Y., Li, D. W., & Wang, X. P. (2010). Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Letters*, 291(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.10.003>
- Zhou, Q., Ye, M., Lu, Y., Zhang, H., Chen, Q., Huang, S., & Su, S. (2015). Curcumin improves the tumoricidal effect of mitomycin C by suppressing ABCG2 expression in stem cell-like breast cancer cells. *PLoS ONE*, 10(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136694>