



Estudio del efecto de dasatinib en combinación con cetuximab en un modelo animal de radioterapia experimental

Marta Baro Serrano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

Estudio del efecto de dasatinib en combinación con cetuximab en un modelo animal de radioterapia experimental

**Marta Baro Serrano
2013**

Estudio del efecto de dasatinib en combinación con cetuximab en un modelo animal de radioterapia experimental

Memoria presentada por
Marta Baro Serrano

Para optar al grado de
Doctor por la *Universitat de Barcelona*

Este proyecto se ha realizado bajo la dirección del Dr. Josep Balart i Serra,
en el grupo de **Radiobiologia Aplicada i Radioterapia Experimental** del *Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia – IDIBELL*.

Tesis adscrita al *Programa de Doctorat en Biomedicina*
de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Barcelona*.
Tutor: Dr. Francesc Viñals Canals

Dr. Josep Balart Serra

Dr. Francesc Viñals Canals

Marta Baro Serrano

Barcelona, 2013



Estudio del efecto de dasatinib en combinación con cetuximab en un modelo animal de radioterapia experimental

Marta Baro Serrano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

A mis padres

A mi familia

A mis amigos

<< Science is wonderfully equipped to answer the question “How?” but it gets terribly confused when you ask the question “Why?” >>

Erwin Chargaff (1905 - 2002). Químico

Índice

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER.	3
1.1. Situación actual.	3
1.2. Bases celulares y moleculares del cáncer.	4
2. LA FAMILIA DE LOS RECEPTORES ErbB. EGFR.	9
2.1. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).	9
2.1.1. Ligandos.	10
2.1.2. Dimerización.	11
2.1.3. Fosforilación.	11
2.1.4. Vías de señalización.	12
2.1.5. Activación del EGFR independiente de ligando.	13
2.1.6. Internalización y degradación. Traslocación al núcleo.	14
2.2. EGFR y cáncer.	16
2.3. Estrategias anti-EGFR.	18
2.3.1. Anticuerpos monoclonales.	18
2.3.1.1. Cetuximab.	18
2.3.1.2. Resistencia a cetuximab.	19
2.3.2. Inhibidores tirosina quinasa.	19
2.4. EGFR y radioterapia	19
2.4.1. Dianas biológicas en radioterapia.	20
2.4.2. Radioterapia y EGFR.	20
2.4.2.1. Efecto del EGFR sobre la radiosensibilización. Vía canónica	20
2.4.2.2. Traslocación del EGFR en el núcleo.	21
2.4.3. Radiosensibilización por el bloqueo del EGFR. Estudios clínicos.	21
3. LA IMPORTANCIA DE SRC EN LA VÍA DEL EGFR.	22
3.1. SRC.	22
3.2. SRC y cáncer.	23
3.3. Estrategias anti-SRC.	23
3.3.1. Dasatinib (DST).	24
3.4. La oncoproteína SRC y su relación con EGFR.	24
3.4.1. Vía de cooperación clásica.	25
3.4.2. Vía de cooperación nuclear.	25
3.4.3. Combinación de anti-EGFR y Dasatinib. Estudios clínicos.	26
3.5. Radioterapia, SRC y EGFR. Estudios clínicos.	26
4. LA IMPORTANCIA DE LA VÍA JAK-STAT EN ONCOLOGIA.	28
4.1. La proteína JAK como mediadores de la señalización de receptores de citoquinas.	28
4.2. Las STATs como factores de transcripción.	29
4.3. Estrategias anti-JAK/STAT.	30
4.3.1. Inhibidores de JAK.	30
4.3.2. Inhibidores de STAT.	31
4.4. JAK-STAT y su relación con EGFR y SRC.	31

5. LA IMPORTANCIA DE cMET EN ONCOLOGIA.	33
5.1. cMET.	33
5.2. cMET y cáncer.	34
5.3. Estrategias anti-cMET.	34
5.4. cMET y su relación con EGFR y SRC.	35
6. LA IMPORTANCIA DEL METABOLISMO EN ONCOLOGIA.	36
6.1. Efecto Warburg.	36
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. CULTIVOS CELULARES.	51
1.1. Células A431.	51
1.2. Células FaDu.	51
1.3. Condiciones de cultivo.	51
1.4. Disgregación de la monocapa.	51
1.5. Recuento celular.	52
1.6. Congelación y descongelación de células.	52
1.7. Detección de micoplasma en los cultivos celulares.	53
2. AGENTES USADOS.	54
2.1. Radiación ionizante.	54
2.2. Ligando EGF.	54
2.3. Los inhibidores anti-EGFR, cetuximab y AG1748.	54
2.4. El inhibidor anti-HER2, AG825.	55
2.5. Los inhibidores de la tirosina quinasa de SRC, dasatinib y PP2.	55
2.6. El inhibidor anti-JAK, pyridone6.	56
2.7. El inhibidor anti-cMet, PHA665752.	56
3. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .	57
3.1. Generación de una población celular resistente a cetuximab (R).	57
3.2. Determinación <i>in vitro</i> del efecto citotóxico de los tratamientos.	58
3.2.1. Ensayo clonogénico.	58
3.2.2. Ensayo de proliferación.	59
3.2.3. Ensayo de MTT.	59
3.3. Determinación de los niveles de EGFR en la superficie celular por citometría de flujo.	60
4. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .	61
4.1. Estabulario y animales.	61
4.2. Generación de tumores en ratones atímicos.	61
4.3. Método para la irradiación de tumores xenoinplantados en ratones.	62
4.4. Monitorización del crecimiento tumoral.	62
4.5. Procesado de las muestras tumorales.	63
5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.	64
5.1. <i>In vitro</i> .	64

5.1.1. Inmunofluorescencia para la cuantificación de BrdU: síntesis de ADN.	64
5.2. <i>In vivo</i> .	65
5.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.	65
5.2.2. Inmunofluorescencia para la cuantificación de BrdU: síntesis de ADN.	66
5.2.3. Inmunohistoquímica para la cuantificación de CD31/PECAM: angiogénesis.	66
6. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.	68
6.1. Western blot.	68
6.1.1. Extracción de proteínas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	68
6.1.2. Cuantificación proteica.	68
6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	69
6.1.4. Transferencia de proteínas.	70
6.1.5. El bloqueo de epítomos inespecíficos.	70
6.1.6. Detección inmunológica con anticuerpos específicos.	70
6.1.6.1 Anticuerpo primario.	71
6.1.6.2. Anticuerpo secundario.	72
6.1.6.3. Detección de la señal.	72
6.1.7. Controles de carga.	72
6.1.8. Análisis y cuantificación de las imágenes.	73
6.2. Secreción de VEGF.	73
6.2.1. Tratamiento de los cultivos y generación de las muestras.	73
6.2.2. ELISA.	73
6.3. Determinación de la actividad GTPasa de RAS.	74
6.3.1. Tratamiento de los cultivos y generación de las muestras.	74
6.3.2. Ensayo de RAS-GTP y Western blot de RAS total.	75
6.4. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH).	76
6.4.1. Tratamiento de los cultivos y generación de las muestras.	77
6.4.2. Ensayo del lactato deshidrogenasa (LDH).	77
7. ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LAS MUESTRAS TUMORALES.	78
7.1. Homogeneización del tumor y extracción de las proteínas.	78
7.2. Preparación y marcaje de las muestras.	78
7.3. Electroforesis bidimensional (2D DIGE).	79
7.4. Digestión enzimática e identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.	79
7.5. Identificación de la función proteica, posibles vías de señalización e interacciones entre las proteínas.	79
8. ESTUDIOS SOBRE ÁCIDOS NUCLEICOS.	81
8.1. Extracción del ADN a partir de <i>pellets</i> celulares.	81
8.2. Cuantificación del ADN.	81
8.3. Amplificación del ADN mediante PCR.	82
8.4. Purificación del ADN y reacción de secuenciación.	82
RESULTADOS	83
1. MODELO EXPERIMENTAL: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO RESISTENTE A CETUXIMAB.	85
1.1. Generación de una línea celular resistente a cetuximab <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	85

2. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.	89
2.1. Resultados obtenidos <i>in vitro</i> .	89
2.2. Resultados obtenidos <i>in vivo</i> .	95
3. CAMBIOS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS.	104
3.1. Resultados obtenidos <i>in vitro</i> .	104
3.2. Resultados obtenidos <i>in vivo</i> .	127
4. CAMBIOS EN LA ANGIOGÉNESIS ASOCIADA A TUMOR INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS.	131
4.1. Exploración del efecto del dasatinib en la secreción de VEGF.	131
4.2. Exploración del efecto del dasatinib en la angiogénesis asociada a tumor.	131
5. CAMBIOS INDUCIDOS EN LA SÍNTESIS DE ADN POR LOS TRATAMIENTOS.	133
5.1. Exploración del efecto del dasatinib en la síntesis de ADN <i>in vitro</i> .	133
5.2. Exploración del efecto del dasatinib en la síntesis de ADN <i>in vivo</i> .	133
6. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL DASATINIB EN EL PROTEOMA	135
DISCUSIÓN	141
CONCLUSIONES	167
ANEXOS	171
REFERENCIAS	191

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BRAF	Quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina B
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
C225	Cetuximab
C7BZO	3-(4-Heptyl)phenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammoniopropanesulfonate
CE	Eficiencia de clonación
cm³	Centímetros cúbicos
cMET	<i>MNNG HOS Transforming gene</i> receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos
CML	Leucemia mieloide crónica
CRAF	Quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina C
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente del ADN
DSB	Roturas de ADN de cadena doble
DST	Dasatinib
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme linked immunoassay</i>
ERK 1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Glut 1	Transportador de glucosa 1
GDP	Guanosín bifosfato
Grb2	Proteína 2 de Unión al Receptor de Factores de Crecimiento
GST	Glutatión S-transferasa

GTP	Guanosín trifosfato
Gy	<i>Gray</i>
h	Hora
H⁺	Ion hidronio
H&E	Hematoxilina y eosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracilil-Etanosulfónico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HIF1	Factor inducible por hipoxia 1
i.p.	Inyección intraperitoneal
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KDa	Kilodaltons
KRAS	<i>Ki- Rat sarcoma</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mg	Miligramos
min	Minutos
mm³	Milímetros cúbicos
mM	Milimolar
mL	Mililitro
MLB	Solución de lisis/lavados de Mg ²⁺
mTOR	<i>mammalian target of ramamycin</i>
MTT	<i>Methylthiazoletetrazolium</i>
MV	Megavoltios
MVD	<i>Microvessel density</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
ng	nanogramos
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
p	Grupo fosfato, indica transferencia de fosfato o fosforilación
P6	Pyridone 6
P70S6K	Proteína ribosomal S6 quinasa 70 KDa

Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
NAD⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
NaF	Sodium floride
R	Resistente a C225
RAF	Quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RI	Radiación ionizante
ROS	Especie reactiva de oxígeno
RNS	Especie reactiva de nitrógeno
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
S(+numero)	Serina, indica transferencia de fosfato a una serina en particular que ocupa una posición específica en la secuencia de aminoácidos de una proteína.
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Dodecil sulfato sódico-Gel de electroforesis en poliacrilamida
SF	Fracción superviviente
SFK	<i>SRC Family kinases</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
SPF	Sala libre de patógenos
SRC	Sarcoma
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIGAR	<i>TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
TK	tirosina quinasa
TKI	Inhibidores de la actividad tirosina quinasa
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
μL	Microlitro

μm	Micrómetro
μM	Micromolar
WT	<i>Wild-type</i>
XRT	Radioterapia
Y(+numero)	Tirosina, indica transferencia de fosfato a una tirosina en particular que ocupa una posición específica en la secuencia de aminoácidos de una proteína.

Introducción

1. EL CÁNCER

El cuerpo humano está compuesto por distintos tipos celulares que se reproducen por división celular y se organizan en tejidos. En condiciones normales, las células mantienen un fino equilibrio entre las señales de proliferación y contención, de modo que la proliferación celular se da cuando es necesaria y se detiene cuando ya no es requerida. En las células tumorales este equilibrio se ve alterado, se produce un crecimiento celular descontrolado y se da una pérdida de diferenciación. Es en este caso cuando hablamos de cáncer.

En el último cuarto de siglo, se ha asociado el cáncer a cambios sucesivos en el genoma humano. Actualmente, son muchas las evidencias que señalan el proceso tumoral como un proceso con múltiples etapas, donde cada una refleja las alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales a malignas y que implica una gran complejidad debido a los distintos sistemas moleculares que están involucrados. Todo este conjunto de etapas es necesario para desregular los sistemas de protección que mantienen la homeostasis celular y previene la aparición del cáncer.

1.1. Situación actual.

Los distintos tipos de cáncer se clasifican en tres grandes categorías: los carcinomas, que son de origen epitelial; los sarcomas, que se originan en el tejido conjuntivo; y las leucemias, que provienen de células hematopoyéticas. El 90 % de los cánceres humanos son carcinomas. Este porcentaje tan elevado es debido al hecho que la mayor parte de la proliferación que tiene lugar en el cuerpo se produce a nivel de epitelios y, además, estos son los que están sometidos a las lesiones físicas y químicas que favorecen el cáncer.

Aparte del componente genético, el ambiente es un factor muy importante para determinar la probabilidad de padecer un determinado tipo de cáncer. Durante muchos años se han realizado estudios epidemiológicos que han puesto de manifiesto distintos índices de incidencia según la situación geográfica. Por ejemplo, el cáncer de próstata y de colon son más comunes en los países desarrollados que en los países en desarrollo, probablemente por los hábitos alimenticios y la contaminación industrial. En cambio, otros cánceres intestinales están más arraigados en los países en desarrollo probablemente por el tipo de cocción de los alimentos. Respecto al cáncer de pulmón y de mama se ha observado que la incidencia es similar en todo el mundo. El primero por la globalización del consumo de tabaco; y el segundo

por cambios en los patrones reproductivos, la obesidad y la inactividad física. En general, la incidencia y la mortalidad están incrementando, aun a pesar de los recientes avances en su tratamiento (Society, 2008).

El cáncer es un problema mundial significativo tanto a nivel de salud pública como socioeconómico. Uno de cada ocho muertos en el mundo se debe al cáncer y, mundialmente es la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda (después de las enfermedades del corazón) en los países en desarrollo. Cada año se diagnostican en el mundo 12'7 millones de casos nuevos, de los cuales 7'6 millones mueren como respuesta a la enfermedad. Los casos nuevos de cáncer y la mortalidad aumentan por el crecimiento y envejecimiento de la población, así como por la reducción de la mortalidad infantil y de las muertes por enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (Society, 2008).

Las principales modalidades de tratamiento para el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Contra neoplasias no diseminadas, la cirugía es el tratamiento de elección siempre y cuando el crecimiento locoregional no sea excesivo. La radioterapia se administra sola o en combinación con la cirugía y/o quimioterapia (www.cancer.org). En los últimos años, se ha impulsado el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos dirigidos específicamente contra moléculas implicadas en el crecimiento alterado de las células tumorales.

1.2. Bases celulares y moleculares del cáncer.

Una sola mutación no provoca la transformación maligna sino que aproximadamente son necesarios entre 3 y 7 sucesos independientes, al azar y de baja probabilidad, para que una célula normal se transforme en cancerígena. Estas mutaciones pueden ser espontáneas, heredadas o promovidas por agentes externos como virus, radiaciones o agentes químicos, los cuales aumentan la frecuencia natural de las mutaciones. El cáncer tiene un origen monoclonal porque proviene de una anomalía que se produce, inicialmente, en una sola célula.

Durante la última década, se han propuesto dos hipótesis complementarias para responder al proceso de transformación maligna:

Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011) sugirieron que la mayoría de los cánceres son la manifestación de 10 alteraciones esenciales de la fisiología celular que, conjuntamente, determinan el crecimiento maligno:

- ✓ *Autosuficiencia en señales de crecimiento.* Para que una célula normal pase de estar en quiescencia a un estado proliferativo son necesarias las señales de crecimiento. Estas se transmiten al interior de la célula mediante receptores de membrana a los que se unen moléculas señalizadoras (ligandos) entre las que se encuentran factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión.
- ✓ *Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento.* En un tejido normal, existen múltiples señales antiproliferativas que mantienen la quiescencia y la homeostasis del tejido. Estas señales también se transmiten mediante receptores de membrana acoplados a circuitos de señalización intracelulares. Las células tumorales evaden estas señales para poder proliferar.
- ✓ *Evasión de la apoptosis.* La resistencia a la apoptosis o muerte celular programada (que debería darse ante células anormales) es una característica del cáncer. La resistencia puede ser adquirida a través de diversas estrategias pero la más común es a través de la inactivación de las proteínas TP53 y retinoblastoma.
- ✓ *Potencial replicativo ilimitado.* Cuando las células llegan a un número determinado de divisiones, detienen su crecimiento para entrar en senescencia, proceso que depende del acortamiento de los extremos de los cromosomas o telómeros. Los telómeros están formados por centenares de repetición de 6 pares de bases (pb) (TTAGGG) que durante cada ciclo celular pierden entre 50 y 100 pb en la replicación del ADN telomérico. El acortamiento de los telómeros tiene un límite y desemboca inevitablemente en la muerte celular. Sin embargo, prácticamente todos los tumores adquieren la capacidad de mantener constante el tamaño de sus telómeros mediante la sobreexpresión de telomerasas, consiguiendo de este modo la inmortalización.
- ✓ *Neo-angiogénesis asociada al cáncer.* La formación de nuevos vasos sanguíneos se da tanto en situaciones normales como durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas o durante el ciclo reproductor de la mujer. El oxígeno y los nutrientes proporcionados por la vasculatura son cruciales para la función celular y supervivencia de los tumores por lo que promueven la angiogénesis alterando la transcripción de genes, siendo paradigmática la sobreexpresión de la vía del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

- ✓ *Invasión de tejidos y metástasis.* Tarde o temprano en la progresión tumoral, algunas células escapan del tumor primario, entran en el torrente sanguíneo o linfático e invaden nuevos tejidos adyacentes o distantes. La función de proteínas relacionadas con la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular se pierde en la mayoría de células epiteliales en el frente de invasión y en el proceso de metastatización. Genes que codifican para la síntesis de proteasas se sobreexpresan, los inhibidores de proteasas se infraexpresan y las formas inactivas de proteasas se activan en las células tumorales, todo ello para poder colonizar los tejidos. Los asentamientos de células a distancia es lo que se conoce como metástasis, y es la causa del 90 % de las muertes por cáncer cuando el tumor primario ha sido controlado.

- ✓ *Desregulación de la energía celular.* La mayoría de las células tumorales usan vías metabólicas anormales para generar energía, hecho que se postuló a principios del siglo XX por Warburg. A pesar de la presencia de oxígeno, las células cancerígenas pueden reprogramar el metabolismo energético potenciando la producción de lactato a partir del consumo (exagerado) de glucosa.

- ✓ *Inestabilidad genética y mutacional.* En las células cancerosas está aumentada la tasa de mutación génica, lo que las lleva a adquirir múltiples mutaciones necesarias para orquestar la tumorigénesis e inducir una malignización progresiva, especialmente cuando se afectan genes involucrados en la reparación del ADN. Ciertas mutaciones confieren una ventaja selectiva en subclones de células, permitiendo su expansión y, finalmente, su dominancia en un tejido. Así, las múltiples etapas de la progresión tumoral puede ser descritas como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales es desencadenada por la posible adquisición de un genotipo mutante oncogénico.

- ✓ *Inflamación.* Históricamente, se atribuyó la presencia de células inmunitarias en los tumores a un mecanismo antitumoral. Sin embargo, se ha observado que la respuesta inflamatoria asociada a tumor tiene un efecto pro-tumoral, a través del suministro de moléculas bioactivas que se liberan desde las células inflamatorias al microambiente tumoral (factores de crecimiento, factores de supervivencia, enzimas que modifican la matriz extracelular y señales de inducción, etc.).

- ✓ *Evasión y destrucción del sistema inmune.* La vigilancia inmune es un proceso celular esencial que de forma proactiva evita la formación de tumores mediante el

reconocimiento y eliminación de las células tumorales. Sin embargo, los tumores que aparecen han podido eludir la detección o reducir el impacto del sistema inmune sobre ellos. Por ejemplo, las células cancerígenas podrían paralizar la infiltración de linfocitos T citotóxicos y de células *natural killers*, a través de la secreción de factores inmunosupresores como el TGF- β . Otros mecanismos operan a través del reclutamiento de células inflamatorias que son inmunosupresoras, incluyendo células T reguladoras y células supresoras derivadas de células mieloides, las cuales pueden suprimir las acciones de los linfocitos citotóxicos.

Vogelstein y Kinzler (Vogelstein and Kinzler, 2004) sugirieron que el cáncer no se podía atribuir al defecto de un solo gen sino que su desarrollo se debía a la alteración de múltiples genes. Propusieron 3 grandes grupos de genes responsables del proceso tumoral:

- ✓ *Oncogenes*. La función de estos genes se asocia con la regulación de la proliferación celular ordenada, pero también regulan otras funciones clave de la célula como la supervivencia, el grado de apoptosis o el metabolismo. Las mutaciones en oncogenes confieren una activación constitutiva que dará lugar a un crecimiento descontrolado, invasividad y malignidad de las células. Pueden ser oncogenes aquellos genes que codifican por receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, miembros de las vías de transducción de señales, factores de transcripción o proteínas implicadas en el control del ciclo celular. Ejemplos de oncogenes son *RAS*, *MYC*, *SRC* y *EGFR*.
- ✓ *Genes supresores de tumor (GST)*. La función principal de estos genes es la de controlar la proliferación celular. A diferencia de los oncogenes, las mutaciones en estos genes reducen la actividad o cantidad de su producto. La mayoría de estos genes codifican por proteínas de reparación del ADN y del control del ciclo celular. Ejemplos de GST son el gen *RB* cuya inactivación conduce a la aparición de retinoblastoma (*RB*) y el gen de la proteína p53 (*TP53*).
- ✓ *Genes estabilizadores*. Su función normal no está relacionada con funciones de regulación de la proliferación sino con el mantenimiento de la integridad del genoma. Su mutación implica un incremento de la acumulación de mutaciones en la célula. Ejemplo de genes estabilizadores es *BRCA1*.

Las mutaciones de oncogenes y genes supresores de tumores operan de forma similar a nivel fisiológico: contribuyen al proceso tumoral incrementando el número de células

tumorales a través de la estimulación de la división celular, la inhibición de la apoptosis o la evasión de los puntos de control del ciclo celular (Vogelstein and Kinzler, 2004). Para acumular todos estos defectos y capacidades pro-tumorales se necesita tiempo, durante el cual los tumores evolucionan a formas más malignas y agresivas. La secuencia concreta en la que las capacidades son adquiridas puede variar mucho, tanto entre tumores de un mismo tipo como de orígenes distintos (Figura 1). En cualquier caso, independientemente de cómo se adquieran estos cambios, las consecuencias biológicas finales son compartidas por todos los tipos de cánceres (Hanahan and Weinberg, 2000).

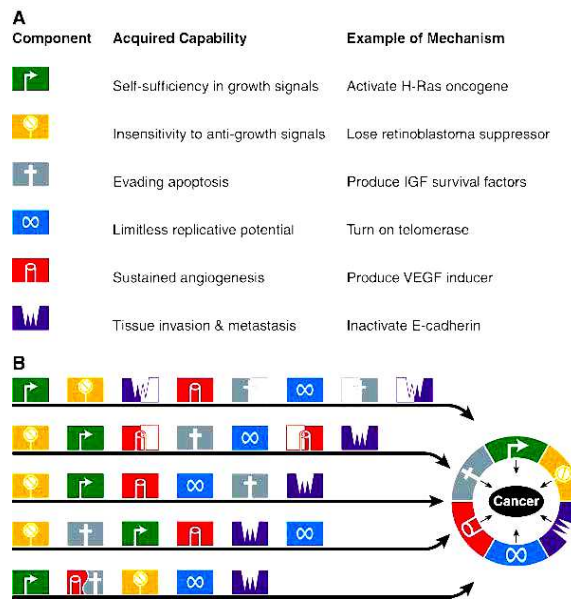


Figura 1. Diversidad en la carcinogénesis. Ejemplos de (A) mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del cáncer, y (B) de distintas vías de progresión en función del orden de adquisición. Extraído de (Hanahan and Weinberg, 2000).

2. LA FAMILIA DE LOS RECEPTORES ErbB. EGFR

Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de proliferar de forma autónoma y desregulada a través de la producción descontrolada de moléculas específicas que promueven el crecimiento celular (factores de crecimiento) o través del aumento de la expresión anormal de proteínas específicas en la membrana celular (receptores de factores de crecimiento) que se unen selectivamente a factores de crecimiento. Ambos procesos desencadenan un conjunto de señales intracelulares que conducen, en última instancia, a la proliferación de las células, la inducción de la angiogénesis y la formación de metástasis. La mayoría de los cánceres epiteliales se caracterizan por la activación funcional de los factores de crecimiento y de los receptores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o ErbB (Ciardiello and Tortora, 2008).

La familia de los ErbB, compuesta por EGFR/ErbB-1/HER1, ErbB-2/HER2/neu, ErbB-3/HER3 y ErbB-4/HER4, es un conjunto de receptores tirosina quinasa directamente involucrados en el crecimiento neoplásico de las células, la proliferación y la supervivencia (Contessa *et al.*, 2006) (Figura2). De entre estos receptores, cabe destacar HER2 al cual, no se le conoce ningún ligando pero es la pareja preferida por los otros miembros de la familia para formar dímeros, y HER3 que no tiene actividad tirosina quinasa (Bowers *et al.*, 2001; Normanno *et al.*, 2006). En general, la desregulación de los receptores HER inicia las cascadas de señalización que promueven la tumorigénesis a través de la proliferación celular, la supervivencia, la migración, la adhesión y la diferenciación (Mass, 2004).

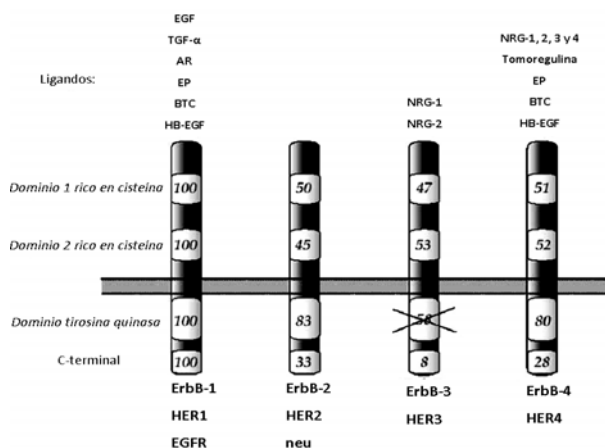


Figura 2. Esquema de los miembros de la familia de receptores y sus ligandos. La familia de los ErbB está formado por 4 miembros: EGFR, ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4. Los números indican el grado (%) de homología con el EGFR. No se conoce ningún ligando de ErbB-2. El ErbB-3 no tiene actividad tirosina quinasa (dominio no funcional marcado con una X). Extraído de (Harari, 2004; Normanno *et al.*, 2006).

2.1. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR es una glicoproteína transmembrana de 170 KDa que contiene una sola cadena polipeptídica de 1.186 aminoácidos.

Se sintetiza en forma de precursor de 1.210 aminoácidos el cual en el proceso de inserción en la membrana plasmática sufre una glicosilación y un acortamiento en el extremo N-terminal. El gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 7, concretamente en la posición p11.2.

Estructuralmente está formado, como todos los miembros de la familia, por 3 dominios principales: un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Harari, 2004). El dominio extracelular está dividido en 4 regiones designadas I, II, III y IV. Las regiones I y III corresponden al lugar de unión al ligando, mientras que las regiones II y IV participan en la dimerización (Marmor *et al.*, 2004; Normanno *et al.*, 2006). La región citoplasmática contiene un dominio tirosina quinasa, formado por un lóbulo N y un lóbulo C donde se encuentra el bucle de activación y centro catalítico de la enzima. Este dominio está seguido por una cola C-terminal con lugares de autofosforilación.

En condiciones fisiológicas, una variedad de ligandos de la familia del EGFR induce la formación de complejos homo- o heterodiméricos entre los 4 receptores ErbB, que promueve una diversificación y amplificación de las señales. En las células tumorales, estos receptores pueden ser activados por distintas formas de patología molecular entre las que destaca la sobreexpresión del receptor por amplificación génica, las mutaciones del dominio tirosina quinasa y la producción autocrina de ligandos (Mendelsohn and Baselga, 2003).

2.1.1. Ligandos.

Los ligandos de receptores ErbB son generados tras la escisión de los precursores transmembrana (Marmor *et al.*, 2004). En relación a la unión a los receptores ErbB, existen tres grupos (Figura 2). El primer grupo incluye el EGF (factor epidérmico del crecimiento), el TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) y la AR (amfiregulina), que se unen específicamente al EGFR. El segundo grupo incluye la BTC (betacelulina), la HB-EGF (factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina) y la EP (epiregulina), que muestran una especificidad dual por EGFR y ErbB-4. El tercer grupo se compone de las NRG (neuregulina) que puede ser dividido en dos subgrupos según su capacidad de unirse a ErbB-3 y ErbB-4 (NRG-1 y 2) o solo a ErbB-4 (NRG-3 y 4). Ningún péptido de la familia del EGF se une a ErbB-2 (Normanno *et al.*, 2006).

2.1.2. Dimerización.

En ausencia de ligando, el receptor es monomérico pero cuando se une provoca un cambio conformacional que promueve la dimerización con otro EGFR (homodimerización) o con otro miembro de la familia (heterodimerización). Este último caso, permite diversificar y expandir el tipo de señal generada por un receptor (Figura 3). Cuando un receptor está inactivo (no unido al ligando) se caracteriza por adoptar una conformación “cerrada”, en la que el brazo de dimerización de la región II está bloqueado por interacciones intramoleculares con el dominio IV. Cuando se une al ligando tiene lugar una reorganización de las regiones dando lugar a una conformación “abierta”, donde las regiones I y III son accesibles para el ligando. Además, el brazo de dimerización (presente en la región II) queda expuesto y puede interactuar con el de otro receptor, promoviendo la unión directa de receptor-receptor. En este dímero formado por dos complejos de receptor-ligando 1:1, los dos ligandos están distanciados el uno del otro y solo interactúan con el receptor, hecho que indica que los ligandos no están involucrados en la dimerización (Marmor *et al.*, 2004; Normanno *et al.*, 2006).

2.1.3. Fosforilación.

Los subdominios I y III del receptor tienen un pliegue beta helicoidal el cual es importante para la unión al ligando. Además, la horquilla beta o “bucle de dimerización” que sobresale del subdominio II de cada monómero unido al ligando, promueve la interacción directa de receptor-receptor y conduce a la formación de un dímero mediante la penetración y estabilización por uniones complementarias entre el bucle de dimerización y el monómero pareja. Aunque las estructuras cristalinas sugieren que el bucle de dimerización es el principal contribuyente, otras regiones de los ErbB, incluyendo el dominio IV, el dominio transmembrana y el dominio quinasa, estarían implicadas en la dimerización y estabilización de los dímeros (Marmor *et al.*, 2004; Normanno *et al.*, 2006). Este proceso de dimerización induciría la autofosforilación/activación del dominio tirosina quinasa del receptor, que a su vez determinaría la fosforilación de aminoácidos tirosina en este dominio y en regiones adyacentes, que actuarían como primera estación emisora de señales bioquímicas específicas enlazadas con una compleja red de señalización corriente abajo —*downstream*— hacia el núcleo celular (Figura 3) (Mass, 2004).

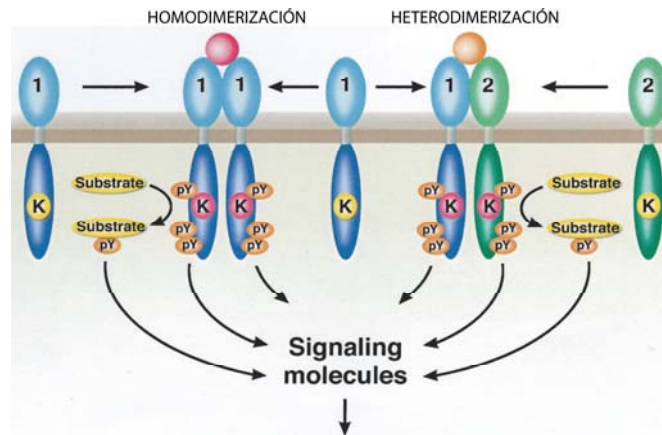


Figura 3. Mecanismos de activación del receptor. El EGFR y los miembros de la familia de los ErbB (HER2/3/4) se activan por dimerización entre receptores homólogos o por heterodimerización. Después de la dimerización, se produce una activación espontánea del dominio tirosina quinasa que resulta en una fosforilación de aminoácidos tirosina. Esto da lugar a un reclutamiento (*anclaje*) y fosforilación de múltiples sustratos intracelulares, Extraído de (Mendelsohn and Baselga, 2003).

2.1.4. Vías de señalización.

Los residuos tirosina quinasa fosforilados sirven como lugar de anclaje para numerosas proteínas adaptadoras que inician las vías de transducción intracelulares. Estas proteínas se unen a través de los dominios de homología a Src-2 (SH2) o de unión a fosfotirosinas (PTB), mientras que la especificidad del reclutamiento está determinada por los aminoácidos que envuelven los lugares de fosforilación del receptor, como por ejemplo, la secuencia aminoacídica ARDPQRYLVIQG la cual es un lugar de unión de la PLC γ al EGFR (Y978) (Marmor *et al.*, 2004; Mendelsohn and Baselga, 2003; Normanno *et al.*, 2006; Songyang *et al.*, 1993).

La regulación de las señales intracelulares activadas es muy compleja ya que participan diversos factores como la identidad del ligando, los receptores presentes en la célula, la disponibilidad de moléculas intracelulares o los efectores que inhiben las señales. Además, un ligando específico desencadena preferentemente la activación de una vía de señalización. Las principales vías de transducción de señales activadas por el EGFR son (Lurje and Lenz, 2009; Mendelsohn and Baselga, 2003) (Figura 4):

- ✓ *Vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK).* La vía de Ras-Raf-MAPK es una importante vía de señalización *downstream* de la familia de los receptores ErbB. La activación de las MAPK fosforila y regula factores de transcripción específicos que inducen la migración y la proliferación celular.
- ✓ *Vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).* Los lugares de anclaje de PI3K están ausentes en el EGFR pero son altamente prevalentes en ErbB-3. Está implicada en el

crecimiento celular, la resistencia a la apoptosis inducida por la quimioterapia, la invasión celular y la migración.

- ✓ *Vía de la quinasa Janus y activadores de la transcripción (JAK/STAT).* La dimerización de STAT induce su traslocación al núcleo donde promueve la transcripción de genes que están implicados en la oncogénesis y la progresión tumoral.
- ✓ *Vía de la proteína quinasa C (PKC).* Su activación está implicada en la progresión del ciclo celular, la motilidad celular y la invasión.
- ✓ *Vía de la SRC quinasa.* Tiene un papel fundamental en la proliferación, la migración, la adhesión y la angiogénesis tumoral. A pesar de que su activación es independiente de la señalización de los RTK pueden interaccionar con el EGFR con el que se ha visto que puede cooperar para amplificar las señales asociadas a la familia de los receptores ErbB o que podría inducir la resistencia asociada a los inhibidores de EGFR.

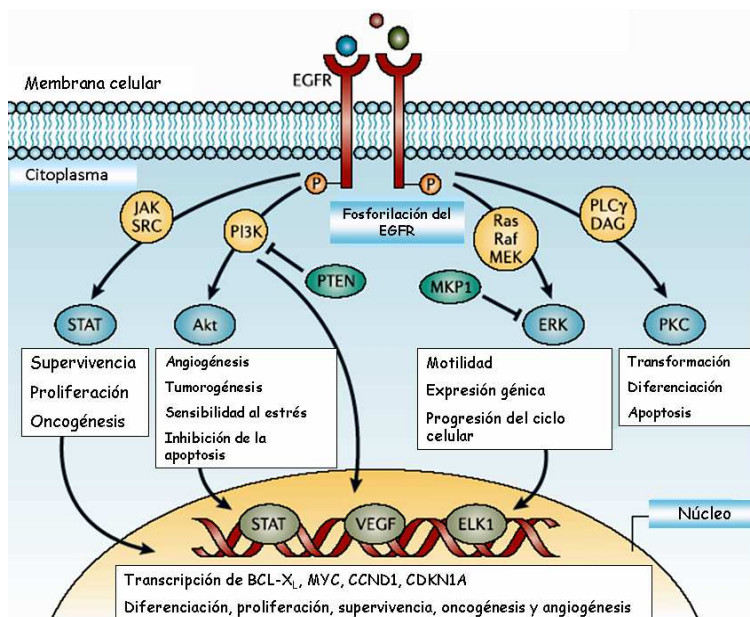


Figura 4. Principales vías de señalización reguladas por EGFR. Extraído de (Nyati *et al.*, 2006).

2.1.5. Activación del EGFR independiente de ligando.

Se han descrito otros mecanismos capaces de inducir la fosforilación del EGFR de modo independiente al ligando. Estos pueden ser:

- ✓ *Transactivación.* Existen proteínas que son capaces de fosforilar residuos de tirosina de la región intracelular de receptor. Por ejemplo, la hormona del crecimiento y la

prolactina activan indirectamente el receptor EGFR a través de la tirosina quinasa Janus 2 (JAK2) (Normanno *et al.*, 2006), y SRC es capaz de fosforilar los residuos de las tirosinas 845 y 1101 del receptor EGFR (Biscardi *et al.*, 1999). Uno de los mecanismos más estudiados es el inducido por las proteínas G asociadas a receptor (GPCRs), que estimulan las metaloproteasas encargadas del procesamiento de los precursores de ligandos de la familia de EGF (Liebmann, 2011).

- ✓ *Como respuesta a una situación de estrés.* El receptor puede ser activado como respuesta a agentes citotóxicos (Khan *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009) y a la radiación ionizante (Dittmann *et al.*, 2005; Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997). En el último caso, se ha demostrado que la radiación ionizante estimula la fosforilación de tirosinas del EGFR en las células MCF-7, A431 y A549, provocando como respuesta adaptativa un crecimiento acelerado (Dittmann *et al.*, 2005; Dittmann *et al.*, 2009a; Schmidt-Ullrich *et al.*, 2003; Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997). Hasta el momento, el mecanismo íntimo por el cual se activa el EGFR en respuesta al estrés oxidativo no se conoce completamente, pero se conoce que en respuesta a la radiación se activa la óxido nítrico sintasa (NOS) cuya activación genera óxido nítrico (NO) que induce la autofosforilación del EGFR en la Y1173 y la activación de las vías de señalización *downstream* del EGFR (Lee *et al.*, 2008).

2.1.6. Internalización y degradación. Traslocación al núcleo.

La estimulación por factores de crecimiento resulta en una rápida endocitosis y degradación del complejo EGFR-ligando. La unión del ligando induce la agrupación del receptor y su recubrimiento en invaginaciones de la superficie celular, seguido de la endocitosis, transporte en vesículas y ocasionalmente la degradación por enzimas lisosómicas. Se ha demostrado que la degradación del EGFR depende de la función tirosina quinasa del receptor. Las mutaciones que inactivan la quinasa del receptor se asocian a un aumento de receptores libres en la superficie celular debido a un incremento del reciclaje y a una disminución de la degradación del EGFR. La rápida endocitosis y degradación del EGFR activado atenúa las señales generadas en respuesta a ligandos. Diversos estudios sugieren que la proteína oncogénica Cbl (*Casitas B-lineage*) juega un papel en la degradación del EGFR y del PDGFR. La unión del EGFR o del PDGFR a Cbl conduce a la ubiquitinación del receptor y una subsiguiente degradación por el proteosoma. Por otro lado, la formación de complejos con receptores activados causa la fosforilación de Cbl seguida por el reclutamiento de proteínas como la PI3K,

sugiriendo que la Cbl podría también estar funcionando como lugar de anclaje para el reclutamiento de efectores (Schlessinger, 2000).

Aunque la vía más conocida de transducción de señales sitúa el EGFR en la membrana plasmática, diversos estudios indican que el EGFR se trasloca directamente desde la membrana al núcleo. Se ha observado la localización del EGFR en el núcleo tanto en líneas celulares establecidas como en distintos tumores primarios de cáncer de mama. Esta localización también se encuentra en una amplia variedad de tejidos no tumorales bajo condiciones fisiológicas diversas. La importación nuclear de receptores de la superficie celular tiene lugar de forma dependiente e independiente al ligando. Para los receptores transmembrana en los que la importación nuclear tiene lugar de modo dependiente al ligando se especula que la internalización del receptor puede servir como un paso inicial para su transporte desde la superficie celular al núcleo ya que la activación del ligando se acopla con la internalización del receptor (Lo and Hung, 2006). En los últimos años, se ha demostrado que esta traslocación también se puede dar de forma independiente al ligando como respuesta a la radiación ionizante (Dittmann *et al.*, 2005; Dittmann *et al.*, 2009a).

Aunque las dianas transcripcionales del EGFR están relacionadas con proliferación, tumorigénesis y progresión tumoral, el papel de la vía nuclear del EGFR está pendiente de una mayor investigación, aun así al EGFR se le atribuyen 3 papeles principales en el núcleo (Dittmann *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2006):

- ✓ *Cofactor de transcripción.* El EGFR se asocia a través de interacciones físicas a STAT3 y E2F1 usando el lugar de unión de estos al ADN para favorecer, mediante su actividad transactivadora (puesto que el EGFR conserva su actividad quinasa), la transcripción de la ciclina D1, iNOS y B-Myb.
- ✓ *Fosforilación del antígeno de proliferación nuclear (PCNA).* La proteína PCNA se encuentra en el núcleo y es un cofactor de la ADN polimerasa δ . La proteína codificada actúa como homotrímero y ayuda a aumentar la capacidad de procesamiento de la síntesis de la cadena primaria durante la replicación del ADN. Además, en respuesta al daño al ADN, la PCNA se ubiquitina y participa en la vía de reparación del ADN que depende de la proteína RAD6 (*Radiation sensitivity 6*). El EGFR fosforila una tirosina específica del PCNA (Y211), estabilizando así su unión con la cromatina. Este proceso relaciona la actividad tirosina quinasa del EGFR nuclear con la proliferación celular y la reparación del ADN a través de la regulación de la función del PCNA.

- ✓ *Regulación de la reparación del ADN inducida por agentes genotóxicos.* El EGFR nuclear fosforila el residuo T2609 de la proteína quinasa dependiente del ADN (DNA-PK) sugiriendo que su actividad tiene un papel durante la reparación no homóloga del ADN. Asimismo, la inhibición del EGFR nuclear inducido por la radiación reduce la actividad de la DNA-PK, incrementa el daño residual del ADN y disminuye la supervivencia en las células A549.

2.2. EGFR y cáncer.

La sobreexpresión del EGFR en carcinomas humanos es frecuente (Tabla 1). En general, la sobreexpresión está asociada a mal pronóstico y resistencia a agentes citotóxicos, incluyendo la radiación ionizante. Niveles elevados de EGFR se han correlacionado con un descenso de la supervivencia en cánceres como los de cabeza y cuello, vesícula, ovario, útero y esófago (Harari, 2004; Mendelsohn and Baselga, 2003). Los niveles de ARNm para EGFR y del receptor en sí mismo se encuentran elevados en los tumores, mientras que en la mucosa o en lesiones displásicas adyacentes no, hecho que sugiere que la hiperactividad del EGFR juega un papel importante en la carcinogénesis (Ang *et al.*, 2004; Harari, 2004).

Tabla 1. Expresión de EGFR en cáncer. Extraído de (Harari, 2004)

Tipo de tumor	Porcentaje de tumores
Vesícula	31–48
Mama	14–91
Útero	90
Colon	25–77
Esófago	43–89
Estomago	4–33
Glioma	40–63
Cabeza y cuello	80–100
Ovario	35–70
Páncreas	30–89
Próstata	40–80
Renal	50–90
Pulmón de célula pequeña	40–80

Los principales mecanismos por los que el receptor está constitutivamente activado en muchos tipos de cáncer son la producción autocrina de ligandos, la sobreexpresión del receptor y la mutación (Thariat *et al.*, 2007).

- ✓ *Incremento de la producción de ligandos.* TGF- α y EGF se encuentran habitualmente coexpresados con el EGFR en distintos tipos de cáncer, y se considera que actúan de manera autocrina y paracrina, conduciendo la activación constitutiva del receptor y a un crecimiento tumoral incontrolado (Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997). Los ligandos

pueden ser secretados por macrófagos, células T y queratinocitos en respuesta al daño tisular, pero también por las mismas células tumorales.

- ✓ *Incremento de los niveles de EGFR.* El aumento de la expresión del EGFR se ha correlacionado con un mal pronóstico en numerosos tipos de tumores malignos (Mendelsohn and Baselga, 2003). La habilidad de transformación de las células puede darse por una activación constitutiva del receptor causada por la dimerización espontánea debido a: (1) proximidad física de los receptores, (2) amplificación del EGFR o (3) potenciación de la transcripción. Se realizó una revisión de 200 estudios (en los que estaban involucrados al menos 20.000 pacientes) para determinar el valor pronóstico del aumento de expresión del EGFR respecto a la reducción de las tasas de supervivencia libre de recidivas o global. De los diez tipos de cáncer para los que había datos suficientes para el análisis, el valor pronóstico era fuerte (70 %) para los tumores de cabeza y cuello, ovario, cérvix, vejiga y esófago; moderado (52 %) para los tumores gástricos, de mama, endometriales y colorrectal; y débil (30 %) para los tumores de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) (Nicholson *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos de los pacientes con elevados niveles de expresión del EGFR son refractarios al tratamiento con inhibidores del EGFR, lo que sugiere que la simple expresión del EGFR no es un predictor robusto de la respuesta a la terapia (Harari, 2004).

- ✓ *Mutaciones.* La mutación más frecuente y mejor caracterizada del EGFR es la que produce la variante EGFRvIII del EGFR. Es el resultado de una deleción de los aminoácidos 6 a 273 que produce una truncación del dominio extracelular. El receptor mutado está constitutivamente activo independientemente de los niveles de ligando. Esta alteración se da principalmente en gliomas (38 %) y en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) (5 %) (Laurent-Puig *et al.*, 2009). Recientemente, se han descrito varias mutaciones somáticas en el gen EGFR que están estrechamente ligadas a una respuesta favorable de los inhibidores tirosina quinasa del EGFR (TKI) gefitinib y erlotinib en pacientes con NSCLC. Las mutaciones tiene lugar en 4 exones del dominio quinasa del receptor: (1) la mutación puntual de G719 en el exón 18, (2) la deleción de los aminoácidos 747 a 750 en el exón 19, (3) inserciones en el exón 20 y (4) las mutaciones puntuales L858 y L861 en el exón 21. Además, también se ha observado que los pacientes que inicialmente responden a gefitinib y erlotinib pueden adquirir nuevas mutaciones en el EGFR como la mutación T790M que confieren resistencia a erlotinib y/o gefitinib (Scaltriti and Baselga, 2006).

2.3. Estrategias anti-EGFR.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico fue el primer receptor que históricamente se asoció a cáncer. Las neoplasias normalmente están vinculadas a la desregulación de este receptor incluyen las de cabeza y cuello, pulmón, colon y mama. Dada la correlación entre la sobreexpresión del EGFR y la progresión tumoral, la inhibición de este receptor se ha convertido en una estrategia importante en la lucha contra el cáncer.

2.3.1. Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales contra EGFR, como el cetuximab, se unen al dominio extracelular del EGFR cuando se encuentra en configuración inactiva, compiten con los ligandos por la unión al receptor mediante la oclusión de la región de unión ligando-receptor, y de ese modo bloquean la activación inducida por la unión del ligando al receptor. Los anticuerpos reconocen exclusivamente al EGFR de modo que son altamente selectivos (Ciardiello and Tortora, 2008). Los mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR son: (1) unión extracelular, (2) internalización de los complejos anticuerpo-receptor, (3) inhibición de las vías de señalización del EGFR, y (4) potenciación de la respuesta inmunológica (Harari, 2004).

2.3.1.1. Cetuximab.

Cetuximab (C225, Erbitux, IMC-C225) es un anticuerpo monoclonal quimérico de 152 KDa obtenido a partir de la región variable del anticuerpo murino y la región constante IgG1 humana. Se une al dominio extracelular del EGFR con una afinidad superior a la de los ligandos naturales del receptor, el EGF y el TGF- α . La unión inhibe la activación del receptor y la señalización downstream asociada que incluye las vías MAPK, PI3K y JAK/STAT (Harari, 2004; Vincenzi *et al.*, 2008). Los mecanismos a través de los que el C225 induce la actividad antitumoral son numerosos. Entre ellos, se incluyen la inhibición de la actividad tirosina quinasa del EGFR, la inhibición de la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la invasión y metastatización, el incremento y activación de moléculas proapoptóticas, y la potenciación de los efectos antitumorales de la radioterapia y la quimioterapia. Además, el cetuximab también es capaz de inducir la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (Mendelsohn, 2001; Vincenzi *et al.*, 2008).

2.3.1.2. Resistencia a cetuximab.

La existencia de inhibidores de EGFR ha convertido al EGFR en la diana molecular más estudiada en la oncología. Sin embargo, el potencial terapéutico de los tratamientos biológicos contra la diana específica EGFR se ha visto ensombrecido por las resistencias en algunos tipos celulares. Algunos de los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a los inhibidores de EGFR, revisados por Wheeler y colaboradores (Wheeler *et al.*, 2010), son: (1) Sobreexpresión del ligando de EGFR TGF- α , (2) Sobreexpresión del receptor EGFR, (3) Falta de ubiquitinación, (4) Modulación del EGFR a través de la familia de las SRC quinasas (SFKs) y aumento de la actividad de las SFKs, (5) La unión y activación del EGFR o HER2 con HER3 promoviendo señales a través de la vía de la PI3K, (6) Traslocación del EGFR al núcleo, (7) Alteración de la angiogénesis por medio del incremento de producción de VEGF, (8) Producción de VEGFR1, (9) Mutaciones en PTEN o Ras, (10) Mutaciones en KRAS que mantiene en un estado constantemente activo el GTP unido generando señales downstream independientemente de la activación de los RTK, (11) La forma truncada EGFRvIII, y (12) La alteración del tráfico de EGFR por medio del inhibidor del crecimiento derivado mamario (MGDI).

2.3.2. Inhibidores tirosina quinasa.

Los inhibidores tirosina quinasa del EGFR (TKIs), como gefitinib y erlotinib, son moléculas de bajo peso molecular que compiten reversiblemente con el ATP para unirse al dominio catalítico intracelular de la tirosina quinasa del EGFR y, por tanto, inhiben la auto-transfosforilación del EGFR y la señalización *downstream* (Harari, 2004). Además, estos inhibidores pueden bloquear diferentes receptores tirosina quinasa, incluyendo otros miembros de la familia del EGFR o la producción del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (Ciardiello and Tortora, 2008).

2.4. EGFR y Radioterapia.

La radioterapia desempeña un papel fundamental en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello. Sin embargo, la tasa de supervivencia libre de recidivas a 5 años para pacientes con cáncer de cabeza y cuello localmente avanzado es tan solo de 30-40 %, ya que la mayoría de los pacientes mueren por la progresión de la enfermedad locorregional a pesar del tratamiento con radioterapia. La repoblación tumoral, la hipoxia, la radioresistencia y las

toxicidades que limitan la dosis de radiación están entre las causas principales que explican la falta de control locoregional (Thariat *et al.*, 2007).

2.4.1. Dianas biológicas en radioterapia.

La investigación de las bases moleculares de la resistencia a la radiación ha conducido al desarrollo de sustancias dirigidas específicamente contra dianas biológicas responsables de esta resistencia. En general, las dianas de estas sustancias deberían estar: (1) sobreexpresadas en una elevada proporción de tumores frecuentemente tratados con radiación, (2) no expresados en los tejidos normales que rodean el tumor, (3) relacionadas con un bajo control locoregional tumoral tras radioterapia y (4) asociadas a mecanismos de radioresistencia conocidos. Estas sustancias dirigidas contra dianas biológicas pueden actuar directamente sobre las células tumorales, el estroma (como por ejemplo los anti-angiogénicos) o interferir con las interacciones célula-célula (Rodemann and Wouters, 2011). También deben interferir con los mecanismos radiobiológicos de la radioresistencia (Toulany *et al.*, 2005; Toulany *et al.*, 2006; Toulany *et al.*, 2008).

Un buen ejemplo de diana biológica implicada en radioresistencia es el EGFR. En diversos estudios se ha correlacionado la elevada expresión de EGFR con una peor respuesta a la radioterapia (revisado en (Ang *et al.*, 2004)). Asimismo, se han realizado distintos estudios con otras dianas potenciales para la combinación con radioterapia como HER2/neu (involucrado en el crecimiento y la diferenciación celular), *P53* (gen supresor de tumores implicado en la transición del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis), *BCL-2/BAX* (genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos), *ciclina D* (quinasa reguladora que modula la expresión de la fase G1 a S del ciclo celular) o factores angiogénicos (Haffty and Glazer, 2003; Huang *et al.*, 2011; Toulany *et al.*, 2010).

2.4.2. Radioterapia y EGFR.

Se han sugerido diversos mecanismos por los que el EGFR estaría implicado en la resistencia a radioterapia.

2.4.2.1. Efecto del EGFR sobre la radiosensibilidad. Vía canónica.

La hiperactividad del EGFR se asocia con un crecimiento agresivo, resistencia a los tratamientos oncológicos y a un mal pronóstico del cáncer (Milas *et al.*, 2003). Los estudios realizados en ratones con carcinomas implantados indican la existencia de una correlación

negativa entre el nivel de expresión de EGFR y la radiocurabilidad del tumor (Akimoto *et al.*, 1999). Del mismo modo, los pacientes con cáncer de cabeza y cuello con sobreexpresión de EGFR tienen una baja respuesta antitumoral a la radioterapia (Ang *et al.*, 2004). La administración, mediante la transfección del gen, de EGFR *in vitro* a células tumorales las protege de la acción citotóxica de la radiación mientras que la inhibición del EGFR con anticuerpos anti-EGFR potencia su radiosensibilidad. La radiación activa el EGFR y la transducción de señales *downstream* en tumores radioresistentes, pero no lo hace en los radiosensibles. La hiperactividad del EGFR se asocia con una mayor repoblación de los tumores irradiados. El EGFR puede ser usado como marcador de la respuesta de los tumores a la radioterapia y como diana terapéutica para mejorar la eficacia de la radioterapia (Milas *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Traslocación del EGFR al núcleo.

Estudios dirigidos por Dittmann y colaboradores (Dittmann *et al.*, 2005) han mostrado que la radiación provoca una traslocación del EGFR al núcleo. Este proceso está acompañado de un influxo de las proteínas Ku70/80 y fosfatasa 1. Como consecuencia, se da un incremento de la actividad de la DNA-PK y de la formación de complejos proteicos esenciales para la reparación de roturas de doble cadena de ADN (DSB) inducidas por la radiación. El bloqueo del EGFR con C225 inhibe, por un lado, el transporte de EGFR al núcleo, la re-activación de la DNA-PK y la reparación de DSB y, por otro lado, potencia el efecto de la radiación ionizante.

2.4.3. Radiosensibilización por el bloqueo del EGFR. Estudios clínicos.

Son diversos los estudios en los que se ha evaluado la eficacia del C225 en combinación con la quimioterapia en cáncer de pulmón de célula no pequeña, colon y páncreas (revisados en (Ciardiello and Tortora, 2008)). La combinación de C225 y radioterapia se ha estudiado principalmente en pacientes con cáncer de cabeza y cuello localmente avanzado (HNSCC). Tras diversos estudios preclínicos y un ensayo piloto, se llevó a cabo un ensayo clínico fase III en pacientes con cáncer localmente avanzado de HNSCC en el que se demostró que la administración simultánea de 8 dosis de C225 con radioterapia mejoró significativamente el control locoregional (ratio a 3 años: 47 % vs. 37 %, $p = 0'005$) sin aumentar los efectos secundarios de la radiación. También, aumentó significativamente el promedio del tiempo de supervivencia (de 29 a 49 meses) y la ratio de supervivencia a 3 años (de 45 % a 55 %). Consecuentemente, esta combinación se aprobó por la FDA para el cáncer de HNSCC (2006; Bonner *et al.*, 2006; Thariat *et al.*, 2007).

3. LA IMPORTANCIA DE SRC EN LA VÍA DE EGFR.

La familia de las SRC quinasas (SFKs) está formada por enzimas de señalización que regulan procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la migración, la apoptosis, la adhesión, la angiogénesis y la metástasis. La familia de SFKs consta de 9 moléculas estructuralmente relacionadas (Src, Blk, Fyn, Yes, Lck, Hck, Fgr y Yrk) con dominios peptídicos conservados, llamados dominios SRC homólogos (SH). Se han definido 4 dominios SH conservados en toda las SFKs. El dominio SH1 es un dominio enzimático de la molécula que posee actividad tirosina quinasa intrínseca. Los dominios SH2 y SH3 facilitan las interacciones intermoleculares entre SRC y proteínas con las que forma complejos. Más específicamente, el dominio SH2 permite interacciones con los residuos fosfotirosina de las proteínas, mientras que el dominio SH3 reconoce los motivos *pro-x-x-pro* presentes en una amplia variedad de moléculas estructurales y de señalización. Estos dominios permiten la participación de las SFKs en numerosos complejos de señalización y la regulación de la actividad quinasa de las SFKs a través de interacciones moleculares. Por último, el dominio NH₂-terminal o dominio SH4 el cual es miristoilado y es responsable de la asociación de las SFKs a las membranas (Kim *et al.*, 2009b).

3.1. SRC.

SRC fue el primer oncogén descubierto como la proteína transformante del retrovirus del pollo, el virus del sarcoma de Rous. En las células normales, SRC está implicado en el control de la división celular, en la producción autocrina de factores de crecimiento y en la motilidad celular (Courtneidge, 2002). El dominio quinasa de SRC tiene una arquitectura de una proteína quinasa bilobulada. Los residuos 267-337 constituyen el lóbulo pequeño (NH₂-terminal) y los residuos 341-520 constituyen el lóbulo grande (C-terminal). El lóbulo pequeño participa en el anclaje y la orientación del ATP; contiene un *loop* rico en glicinas (G) que forma parte del lugar de unión de nucleótidos fosfato. El lóbulo grande es el responsable de la unión al sustrato proteico aunque también se encuentra parte del lugar de unión del ATP. Este lóbulo se estructura en forma helicoidal. El lugar catalítico de SRC se encuentra en una hendidura entre los dos lóbulos, los cuales pueden moverse para poder abrir o cerrar la hendidura. La forma abierta es necesaria para permitir el acceso del ATP al sitio catalítico y para liberar el ADP, mientras que la forma cerrada es necesaria para que los residuos entren en un estado catalíticamente activo. La SRC quinasa y los otros miembros de la familia tienen dos lugares de auto-fosforilación principales: la fosforilación de la tirosina 418, la cual activa SRC, y la tirosina

529, la cual es inhibitoria. La forma inactiva de SRC es desestabilizada por la desfosforilación de la tirosina 529 y por la fosforilación de la tirosina 418 en el *loop* de activación. En el estado inactivo, la Y418 se encuentra secuestrada y no puede ser usada como sustrato para la fosforilación de otra quinasa. Cuando la Y529 se disocia o se desplaza desde el lugar de unión al dominio SH2, la proteína se desbloquea y el amarre ya no bloquea el dominio catalítico como en la forma inactiva. Por otra parte con la disociación de la Y529, los *loops* hélice- α C y de activación pueden asumir sus conformaciones activas (intercambio). La Y418 puede experimentar a través de otra quinasa de SRC su autofosforilación induciendo de este modo a la estabilización del estado activo de la proteína (Figura 5) (Roskoski, 2004).

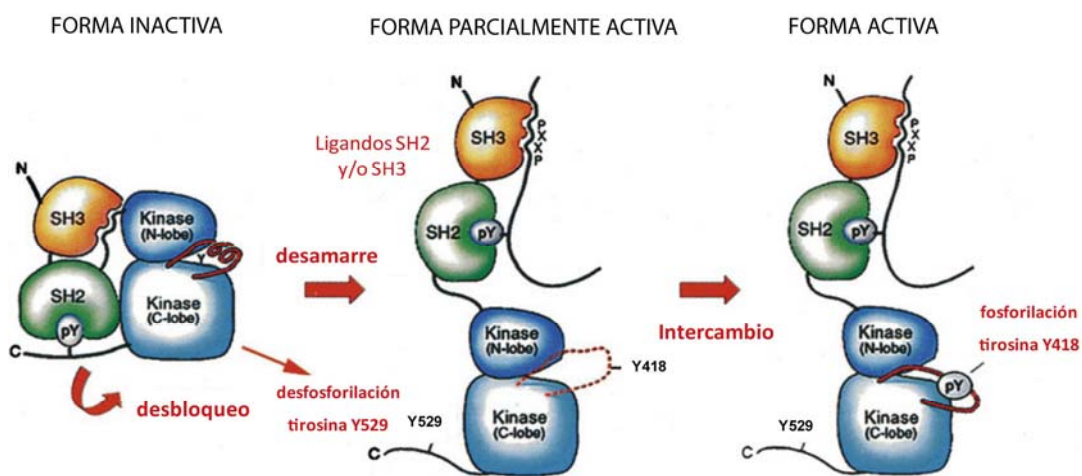


Figura 5. Activación de SRC por desbloqueo, desamarre e intercambio. Extraído de (Harrison, 2003).

3.2. SRC y cáncer.

Las acciones de SRC son pleiotrópicas e incluyen efectos en la morfología celular, la adhesión, la migración, la invasión, la proliferación, la diferenciación y en la supervivencia. La hiperactividad de SRC conduce a una malignización progresiva muy común en cáncer humano (colon, mama, ORL, pulmón). La activación de SRC se produce generalmente por alteraciones estructurales mediadas por quinasas o fosfatasas *upstream* (Courtneidge, 2002). Recientemente, se ha descrito la cooperación entre SRC y STAT3 en cáncer HNSCC y NSCLC (Sen and Johnson, 2011). La aparición de mutaciones activadoras o las amplificaciones del gen son muy raras.

3.3. Estrategias anti-SRC.

Debido a que las SFKs son componentes críticos en muchos procesos intracelulares que promueven la progresión tumoral, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas

para inhibir las SFKs (Kim *et al.*, 2009a). La inhibición de SRC reduce la progresión tumoral en diversos tipos de células tumorales lo que sugiere que SRC es una diana potencial en la terapéutica clínica. Existen diversos inhibidores de SRC en fase de investigación clínica, como dasatinib (BMS-354825, Sprycel), bosutinib (SKI-606), saracatinib (AZD530), ponatinib (AP24534), bafetinib (INNO-406) y el inhibidor del sustrato del lugar de unión Kxo-I (KX2-391). Los datos preliminares sugieren que estos agentes se toleran bien a las dosis en las que se obtiene una concentración del fármaco en el plasma clínicamente significativa (Sen and Johnson, 2011).

3.3.1. Dasatinib (DST).

Dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) es un inhibidor competitivo del ATP de múltiples tirosina quinasas incluyendo la Bcr-Abl, c-KIT, PDGFR, Btk, EphA, EphB, y las SFKs. Actualmente está aprobado por la FDA para el tratamiento de adultos con leucemia mieloide crónica (CML) en fase blástica crónica, acelerada, mieloide o linfoide que presentan resistencia o intolerancia al tratamiento previo, incluido el tratamiento con imatinib, y para el tratamiento de adultos con leucemia linfoblástica aguda cromosoma Filadelfia positivo (Ph⁺ ALL) que presentan resistencia o intolerancia al tratamiento previo (Kim *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2006). En general, los estudios preclínicos demuestran que DST tiene efectos variables en la proliferación celular y que con poca frecuencia induce la apoptosis, pero que inhibe consistentemente la adhesión celular, la migración y la invasión. Además, los efectos adicionales del DST podrían resultar beneficiosos para la prevención de metástasis (Araujo and Logothetis, 2010). Como tal, los efectos de DST pueden ser descritos como citostáticos en vez de citotóxicos. Es importante tener en cuenta que los agentes citostáticos inhiben el crecimiento tumoral pero no inducen una reducción del tumor.

La tirosina reguladora 418 de SRC puede servir como biomarcador de la inhibición farmacológica de SRC (Luo *et al.*, 2008). La disminución de la fosforilación de Y418 se ha empleado en estudios clínicos para determinar el efecto de DST sobre SRC (Kim *et al.*, 2010).

3.4. La oncoproteína SRC y su relación con EGFR.

La co-expresión de SRC y de la familia de los receptores ErbB se ha observado en diferentes tipos de tumores. Este hecho ha fomentado el estudio de posibles sinergismos entre estas oncoproteínas. Un ejemplo es la cooperación entre EGFR y SRC en distintos tipos tumorales, la cual explicaría alguna de las causas de la resistencia a C225 (Camp *et al.*, 2005;

Dittmann *et al.*, 2008; Kruser and Wheeler, 2010; Li *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2010; Wheeler *et al.*, 2009). Asimismo, también se ha descrito el sinergismo de HER2 y SRC donde las tirosina quinasa de ambas oncoproteínas protegen a las células de cáncer de mama del daño en el ADN (Seoane *et al.*, 2010).

3.4.1. Vía de cooperación clásica.

Una de las vías de cooperación entre EGFR y SRC es la transfosforilación de los aminoácidos tirosina en la posición 845 y 1101 del EGFR por la quinasa de SRC. Las tirosinas 845 y 1101 son puertos de anclaje de proteínas de señalización que activan *downstream* a ERK1/2, AKT y STAT3/5 (Figura 6) (Biscardi *et al.*, 1999; Camp *et al.*, 2005; Kruser and Wheeler, 2010; Lu *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2006; Tice *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2010).

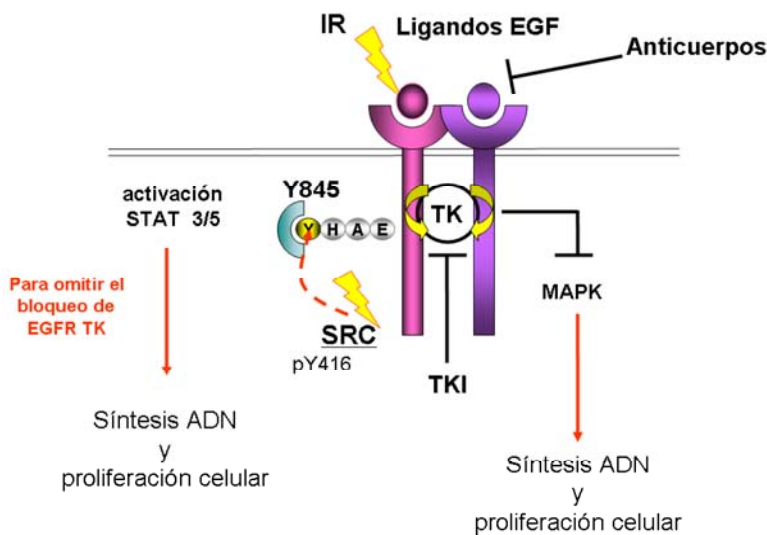


Figura 6. Vía de cooperación clásica entre EGFR y SRC.

3.4.2. Vía de cooperación nuclear.

Otra vía de cooperación entre EGFR y SRC tiene lugar con el transporte del EGFR al núcleo donde SRC juega un papel importante al activar proteínas como la Caveolina-1 que participan en la migración (Figura 7) (Dittmann *et al.*, 2008; Dittmann *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2009).

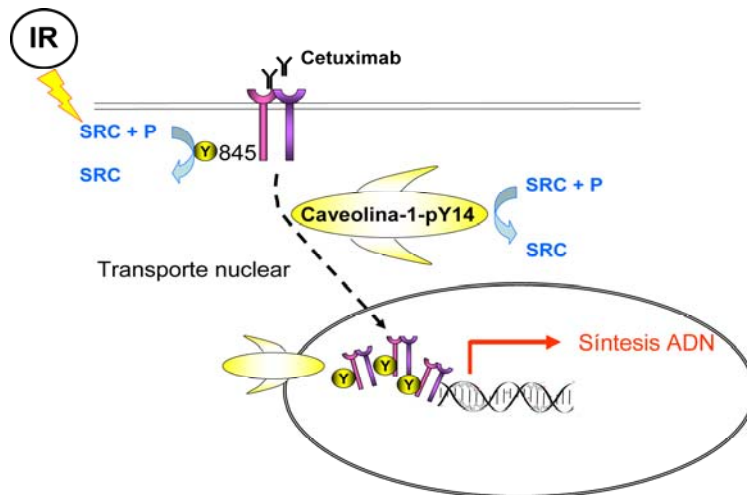


Figura 7. Vía de cooperación nuclear entre EGFR y SRC.

3.4.3. Combinación de anti-EGFR y DST. Estudios clínicos.

Song y colaboradores establecieron en el 2006 que el destino celular (la muerte vs. la detención del crecimiento) en las células de cáncer pulmón expuestas a DST era dependiente del estado del EGFR y que una determinación previa de los cánceres de pulmón que dependen del EGFR para el crecimiento y/o supervivencia puede ayudar a identificar pacientes que podrían obtener un mayor beneficio de DST y de su combinación con inhibidores de EGFR (Song *et al.*, 2006). Además de este estudio preclínico, existen otros estudios que avalan la combinación concomitante de inhibidores de EGFR y SRC en cáncer colorrectal con KRAS mutado (Dunn *et al.*, 2010), en células cancerígenas de mama (Nautiyal *et al.*, 2010), glioblastoma (Lu *et al.*, 2009) y en CML (Shah *et al.*, 2008).

Existen diversos ensayos clínicos en marcha para evaluar la combinación de fármacos anti-EGFR y anti-SRC. En un estudio fase II de pacientes con adenocarcinoma de pulmón con EGFR mutante y resistentes a erlotinib y gefitinib, DST no modificó la progresión tumoral (Johnson *et al.*, 2011). Por el contrario en pacientes con NSCLC avanzado, la combinación de erlotinib y DST mostró actividad antitumoral (Haura *et al.*, 2010).

3.5. Radioterapia, SRC y EGFR. Estudios clínicos.

En el 2009, Dittmann y colaboradores describieron un mecanismo molecular que relacionaba radiación, SRC y EGFR. Los ROS/RNS inducidos por la radiación pueden generar productos de peroxidación fosfolipídica que, a su vez, provocan un cambio conformacional en la proteína SRC que resulta activada. Según este mecanismo de acción, la radiación puede activar SRC y de forma indirecta activar EGFR vía SRC (Dittmann *et al.*, 2009a; Dittmann *et al.*,

2009b; Li *et al.*, 2006). En HNSCC, DST inhibe el proceso por el cual el C225 y la radioterapia pueden promover la translocación del EGFR al núcleo sugiriendo que DST limitaría este mecanismo potenciando los efectos de la radioterapia y C225 (Li *et al.*, 2010). Recientemente, también se ha demostrado que DST induce la apoptosis y bloquea la reparación del ADN en células de HNSCC que expresan EGFR mejorando así el efecto resultante de la radioterapia (Raju *et al.*, 2012).

4. LA IMPORTANCIA DE LA VÍA JAK-STAT EN ONCOLOGÍA.

La interacción de la proteína *Janus Activated Kinase* (JAK) con las proteínas de la familia *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STATs) es esencial en la fisiología celular. Interviene en la regulación de la respuesta a las citoquinas y hormonas clásicas, entre ellas la hormona del crecimiento y la prolactina (Lai and Johnson, 2010).

Los primeros estudios en la mosca de la fruta indicaron que la vía JAK-STAT es importante en la leucemia humana. La hiperactividad de JAK da lugar a defectos hematopoyéticos similares a los de la leucemia. La vía JAK-STAT también está sobreactivada en tumores en carcinomas escamosos de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) y cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC) (Lai and Johnson, 2010).

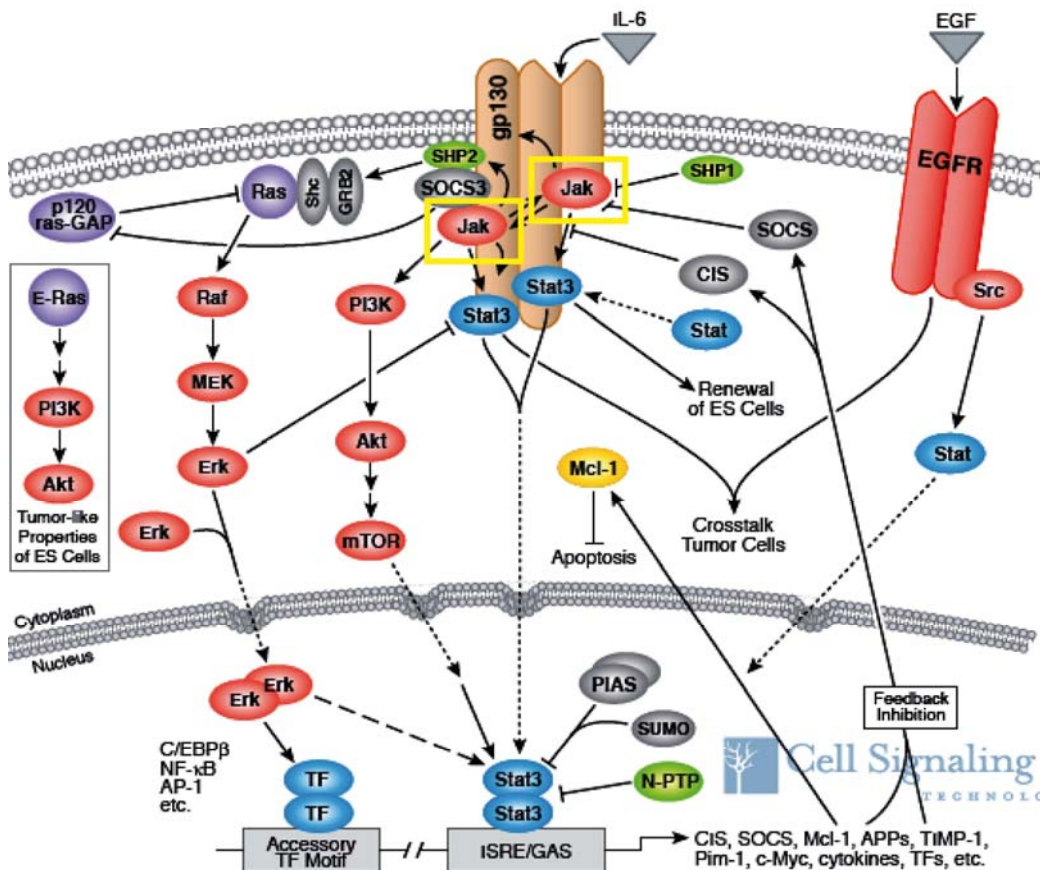


Figura 8. Vía de señalización JAK-STAT. Extraído de *Cell Signaling Technology*.

4.1. La proteína JAK como mediadores de la señalización de los receptores de citoquinas.

En humanos, la familia de las JAKs está formada por 4 miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y tirosina quinasa 2 (TYK2). Las JAKs tienen un peso entre 110 y 140 kDa y su activada enzimática

corresponde a la de una fosfolirasa de aminoácidos tirosina de otros dominios proteicos. Las JAK se encuentran prácticamente expresadas en todas partes, con la excepción de la JAK3, cuya presencia se da sólo en células hematopoyéticas, endoteliales y de músculo liso vascular. Las proteínas JAK contienen dos dominios quinasa. El dominio JH1 es una proteína tirosina quinasa clásica. El JH2 es un dominio pseudoquinasa que no tiene actividad quinasa funcional pero que regula la actividad del dominio JH1. Los dominios JH3-7 regulan la actividad quinasa y la unión de proteínas. Además, las JAKs contienen dos lugares de fosforilación conservados adyacentes al lugar de activación (Y1007/1008 en JAK2) que regulan su actividad quinasa (Lai and Johnson, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2007). Las JAKs son activadas y se unen constitutivamente a los receptores citoquina en respuesta a señales externas. Tras la unión del ligando, los receptores citoquina se dimerizan o se oligodimerizan, induciendo cambios conformacionales que provocan la yuxtaposición de las proteínas JAK, permitiendo su activación por la transfosforilación de múltiples residuos. Las moléculas de JAK activadas fosforilan múltiples residuos de los receptores citoquina que permiten la unión de proteínas que contienen dominios SH2 como las STATs. Una vez unidas a los receptores citoquina fosforilados, las STATs se convierten en sustratos de JAK que una vez fosforiladas (STATs) dimerizan y se traslocan al núcleo. Otros eventos que tiene lugar *downstream* de JAK incluyen la activación de las vías de MAPK y PI3K, y la creación de lugares de unión para c-SRC, PI3K, fosfatasas y proteínas adaptadoras (Grb2, Shc y Cbl) (Figura 8). Además de los receptores de citoquinas, las JAKs también pueden ser activadas por los receptores de factores de crecimiento y por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Lai and Johnson, 2010).

4.2. Las STATs como factores de transcripción.

En humanos, la familia de las STATs está formada por siete proteínas (STAT1–STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) codificadas por genes separados. Funcionan en la fisiología humana normal y en el desarrollo pero también regulan la señalización oncogénica en diferentes tipos de tumor. De las siete proteínas de la familia, la STAT3 y 5 son las que están más frecuentemente implicadas en la progresión del cáncer humano ya que conducen a una mayor expresión de genes diana que inducen una mayor proliferación, supervivencia, angiogénesis y evasión del sistema inmune. Las proteínas STAT tienen un tamaño de entre 90 y 155 KDa y comparten unas características estructurales comunes que incluyen 6 dominios conservados: un dominio de oligodimerización, un dominio de súper hélice, un dominio de unión al ADN que determina la especificidad de la unión al ADN, un dominio de enlace, un dominio SH2 que permite la unión y dimerización del receptor, y un dominio de activación de la transcripción

que contiene un residuo serina conservado (Lai and Johnson, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2007). La activación de las STAT3 es inducida por la fosforilación de la tirosina 705 del dominio SH2, resultando en la dimerización, traslocación nuclear y activación de la transcripción de genes diana. Adicionalmente, la fosforilación de la serina 727, situada el dominio de transactivación C-terminal, da lugar a una mayor activación de la transcripción y en una mayor capacidad de unión al ADN (Lai and Johnson, 2010; Plaza-Menacho *et al.*, 2007). Las STATs también pueden ser activadas de manera independiente a JAK por otras proteínas con actividad tirosina quinasa, bien sean de localización citosólica, (SRC y ABL) bien sean receptores transmembrana (receptores de factores de crecimiento, EGFR, PDGFR, etc.) (Lai and Johnson, 2010; Silva, 2004; Xi *et al.*, 2003).

4.3. Estrategias terapéuticas anti-JAK-STAT.

La implicación de la vía JAK-STAT en distintos tipos de cánceres y en distintos procesos de la progresión tumoral, ha promovido el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra JAK o STAT. Además, el estado funcional de la vía de transducción JAK/STAT tiene un gran potencial como biomarcador predictivo de la respuesta a los tratamientos biológicos.

4.3.1. Inhibidores de JAK.

La mayoría de los inhibidores de JAK que son evaluados en ensayos clínicos están disponibles por vía oral y pertenecen al grupo de moléculas pequeñas inhibitoras de las quinasa por competición con el ATP. Los inhibidores que inhiben JAK2 son clasificados como específicos (clase I) y aquellos que inhiben cualquier otro miembro de la familia de JAK son clasificados como no específicos (clase II). Algunos de los inhibidores de JAK que están en desarrollo clínico son (Lai and Johnson, 2010):

- ✓ *INCB018424, XL019, TG101348 y Lestaurtinib (CEP-701)*. Son inhibidores de JAK2 selectivos que se encuentra en ensayos clínicos de fase I o II.
- ✓ *CYT387, LS104, AT9283, MK-0457, SB1518, VX-509 y AZD1480*. Son otros inhibidores de JAK que se encuentran en las primeras fases de ensayo clínico y que aún no se tienen datos clínicos sobre ellos.
- ✓ *AZ960, WP1066, Go6976 y CP-690,550*. Son otros candidatos a ser usados en clínica en el futuro.

4.3.2. Inhibidores de STAT.

La activación constitutiva de STAT3 y su implicación en la tumorigénesis ha hecho de STAT3 uno de los focos principales de la investigación de dianas terapéuticas en tumores sólidos. Aunque varios agentes específicos de STAT3 son prometedores, ninguno está en desarrollo clínico sobre todo por problemas con la administración y estabilidad de los fármacos. Algunas de las estrategias para usadas para la inhibición de STAT son (Lai and Johnson, 2010):

- ✓ *Inhibidores de STAT que bloquean el dominio SH2.* El motivo SH2 facilita la dimerización de STAT3 y la interacción con receptores específicos a través de sus motivos fosfotirosina. Esto es crítico para la función de STAT3. Aunque se han identificado numerosos agentes con resultados preliminares prometedores, requieren de trabajo químico adicional para obtener análogos con una mayor actividad, selectividad y especificidad para facilitar su desarrollo clínico.
- ✓ *Inhibidores de STAT que bloquean el dominio de unión al ADN.* Estos agentes están dirigidos a interrumpir la interacción entre STAT3 y el ADN.
- ✓ *Inhibidores de oligonucleótidos de STAT3.* Su estrategia está diseñada para inhibir la expresión génica diana usando tecnología de oligonucleótidos como los ARN antisentido, siARN y oligodeoxinucleótidos señuelo. Estos últimos usando STAT3 de señuelo está siendo examinado en un ensayo clínico en fase 0.
- ✓ *Inhibidores de STAT que bloquean el dominio N-terminal.* El dominio N-terminal es responsable de las interacciones proteína-proteína entre los dímeros de STAT3 y del ensamblaje de la maquinaria transcripcional cuando el STAT3 está unido al ADN.

4.4. JAK-STAT y su relación con EGFR y/o SRC.

La colaboración entre STAT, EGFR y/o SRC se ha establecido a partir de distintos estudios (Figura 9) (Silva, 2004; Xi *et al.*, 2003). Jaganathan y colaboradores presentaron evidencias que la múltiple inhibición de EGFR y STAT3 o SRC y STAT3 induce fuertes respuestas antitumorales en cáncer pancreático que sugieren un complejo *cross-talk* y una cooperación funcional entre estas vías de señalización (Jaganathan *et al.*, 2010). De forma similar, Nagaraj y colaboradores demostraron *in vitro* e *in vivo* que la fosforilación de STAT3 en presencia de erlotinib estaba asociada con la resistencia a DST en un modelo de cáncer pancreático (Nagaraj

et al., 2011). La aparición de estudios en los que se describió que la inhibición sostenida de SRC produce la fosforilación reactiva de STAT3 a través de las JAK quinasas (Byers *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2009), demostró la existencia de una vía de activación de STATs independiente de EGFR y SFKs (Figura 9).

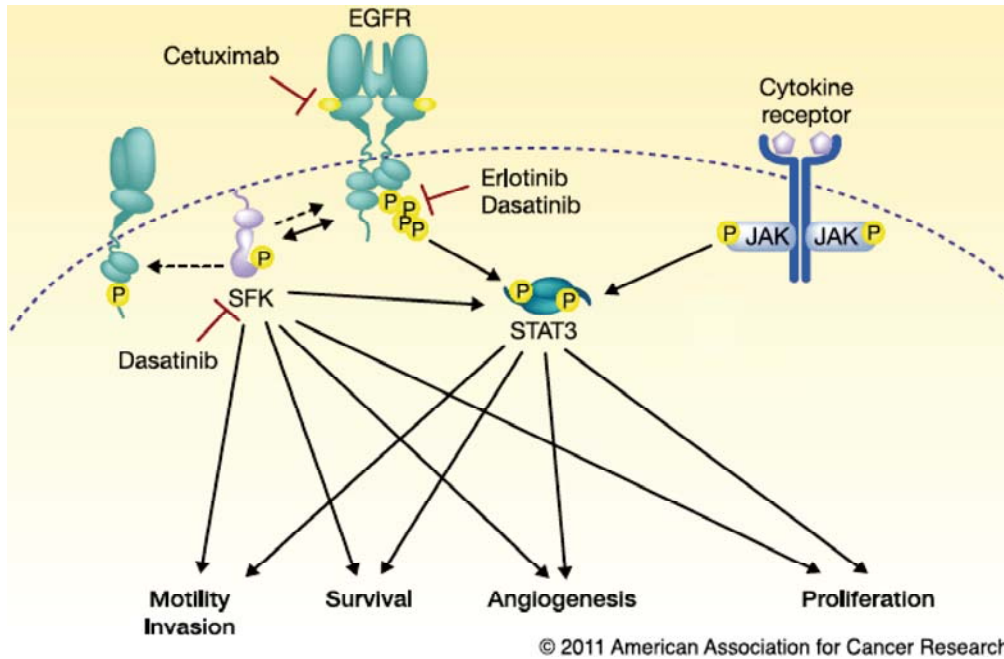


Figura 9. Vías alternativas de activación de STAT3 en presencia de inhibidores de EGFR y SRC. Las flechas continuas indican la activación de componentes o vías de señalización. Las flechas discontinuas indican la fosforilación independiente de la activación. Extraído de (Egloff and Grandis, 2011).

5. LA IMPORTANCIA DE cMET EN ONCOLOGÍA.

El factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) y su receptor, cMET, promueven la proliferación celular, la supervivencia, la motilidad y la invasión, así como también los cambios morfogénicos que estimulan la reparación de un tejido y la regeneración en células normales pero que también pueden ser cooptados durante el crecimiento tumoral (Blumenschein *et al.*, 2012; Martin and Jiang, 2010).

5.1. cMET.

El receptor cMET es un heterodímero unido por disulfuros compuesto de una cadena α extracelular y una cadena β transmembrana. La cadena α contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una porción citoplasmática. La porción citoplasmática contiene un dominio yuxtamembrana, un dominio tirosina quinasa y una cola C-terminal esencial para el acoplamiento de los sustratos y la señalización *downstream*. La unión del HGF activo al cMET funcional conduce a la dimerización/multidimerización del receptor, la fosforilación de múltiples residuos tirosina en la región intracelular, la activación catalítica, y la señalización *downstream* por el acoplamiento de sustratos, transduciendo múltiples actividades biológicas como motilidad, proliferación, supervivencia y morfogénesis (Blumenschein *et al.*, 2012). La unión de HGF induce la autofosforilación de cMET en los residuos Y1234 y Y1235 del dominio tirosina quinasa el cual regula la actividad quinasa. La fosforilación en los residuos Y1349 y Y1356 cerca de la región C-terminal forma un lugar de acoplamiento multifuncional que recluta adaptadores intracelulares a través del dominio SH2, u otros motivos, activando la señalización *downstream*. Los principales sustratos son STAT3, Grb2, Gab 1, PI3K, Shc, Src, Shp2 y Ship1 (Figura 10). La vía HGF-cMET está modulada por otras proteínas, incluyendo la $\alpha6\beta4$ -integrina, la plexina B1 y el receptor Fas. Además, la activación de otros RTK puede potenciar los efectos de HGF-cMET. El EGFR juega un papel importante potenciando la proliferación y la invasión mediada por HGF-cMET en células epiteliales, y cMET puede sinergizar con HER2 para promover el fenotipo maligno. Otros posibles reguladores son la proteína RAS (un *feedback loop* positivo) y la hipoxia (regula la actividad de cMET a través de la angiogénesis tumoral) (Blumenschein *et al.*, 2012).

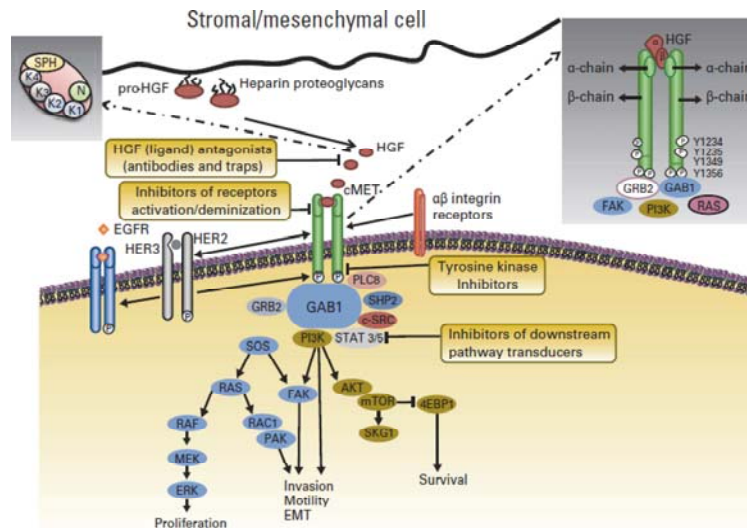


Figura 10. La vía de señalización del factor de crecimiento de los hepatocito (HGF)-cMET y las estrategias terapéuticas dirigidas en marcha. Extraído de (Blumenschein *et al.*, 2012).

5.2. cMET y cáncer.

El receptor de HGF, cMET, se encuentra principalmente expresado en células de tumores epiteliales. También se encuentra sobreexpresado en las células estromales e intersticiales derivadas de tumores como el fibrosarcoma y otros tipos de sarcomas. La sobreexpresión de cMET, con o sin amplificación del gen, se ha observado en una amplia variedad de tumores humanos entre ellos en cáncer de mama, pulmón y de aparato digestivo. Asimismo, los niveles elevados de HGF y/o cMET se correlacionan con mal pronóstico en muchos tipos de cáncer (mama, ovario, cérvix, gástrico, HNSCC y NSCLC).

La amplificación génica y la sobreexpresión proteica de cMET confiere resistencia a los inhibidores de EGFR en modelos preclínicos y en pacientes (Blumenschein *et al.*, 2012; Martin and Jiang, 2010). Aunque la sobreexpresión del receptor cMET puede inducir un activación de la quinasa de forma independiente al ligando, su activación en cáncer ocurre principalmente a través de un mecanismo dependiente del ligando. El propio HGF puede activar la transcripción de cMET. HGF es particularmente activo en el estroma reactivo de los tumores y se expresa en todo el cuerpo, sugiriendo que permite un *feedback loop* paracrino positivo apoyando la diseminación de las células cancerígenas (Blumenschein *et al.*, 2012).

5.3. Estrategias anti-cMET.

La prevalencia de la activación de la vía HGF-cMET en cánceres humanos ha promovido el desarrollo de fármacos dirigidos contra esta diana. Estas terapias dirigidas consisten en (Blumenschein *et al.*, 2012):

- ✓ *Antagonistas biológicos.* Estas moléculas previenen la interacción entre el ligando y el receptor o eventos relacionados con la superficie celular como la agrupación de receptores, pero que son incapaces de activar la señalización *downstream*. Algunos de estos agentes que se encuentran en desarrollo clínico son: (1) análogos de HGF competitivos, (2) variantes competitivas de cMET, (3) anticuerpos contra HGF y (4) anticuerpos contra cMET.

- ✓ *Moléculas pequeñas inhibitoras o compuestos sintéticos de bajo peso molecular dirigidas contra la unión del ligando o la activación del receptor.* La mayoría de ellos compiten por el lugar de unión de ATP en el dominio tirosina quinasa (TK) de cMET, para prevenir la transactivación del receptor y el reclutamiento de efectores *downstream*. Otros pueden unirse en una región de cMET fuera del lugar de unión de ATP afectando a la activación quinasa alostérica. Algunos de estos agentes que se encuentran en desarrollo clínico son: (1) inhibidores TK cMET no selectivos y (2) inhibidores TK cMET selectivos.

5.4. cMET y su relación con EGFR y/o SRC.

La activación de cMET puede ser modulada por otras proteínas, entre ellas EGFR y/o SRC. Mueller y colaboradores evidenciaron que cMET y c-SRC cooperan para compensar la pérdida de la actividad quinasa del EGFR por los inhibidores TK en cáncer de mama (Mueller *et al.*, 2008). Más tarde, se describió que la asociación de EGFR/MET regula la resistencia a inhibidores TK del EGFR en algunos casos de cáncer de mama, de NSCLC (donde SRC forma parte del complejo EGFR/MET) y en casos de NSCLC con EGFR mutado (Mueller *et al.*, 2010; Turke *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2009). Por otro lado, la colaboración entre SRC y MET se ha observado en líneas celulares gástricas con activación constitutiva de MET y que presentan resistencia a DST. Éstas se resensibilizaron a DST con la depleción de MET lo que sugiere que la activación de MET contribuye a la resistencia frente DST (Okamoto *et al.*, 2010). El conjunto de estos estudios sugieren que la inhibición de MET en combinación con inhibidores de SRC y/o EGFR puede ser un mecanismo muy efectivo para inhibir el crecimiento tumoral.

6. LA IMPORTANCIA DEL METABOLISMO EN ONCOLOGÍA.

En presencia de oxígeno, la mayoría de las células diferenciadas metabolizan la glucosa a dióxido de carbono a través de la oxidación de piruvato glucolítico en el ciclo tricarbónico (TCA). Esta reacción produce NADH, el cual estimula la fosforilación oxidativa para maximizar la producción de ATP, con una producción mínima de lactato (Figura 11). Es tan solo bajo condiciones anaeróbicas cuando las células diferenciadas producen elevadas cantidades de lactato (Vander Heiden *et al.*, 2009).

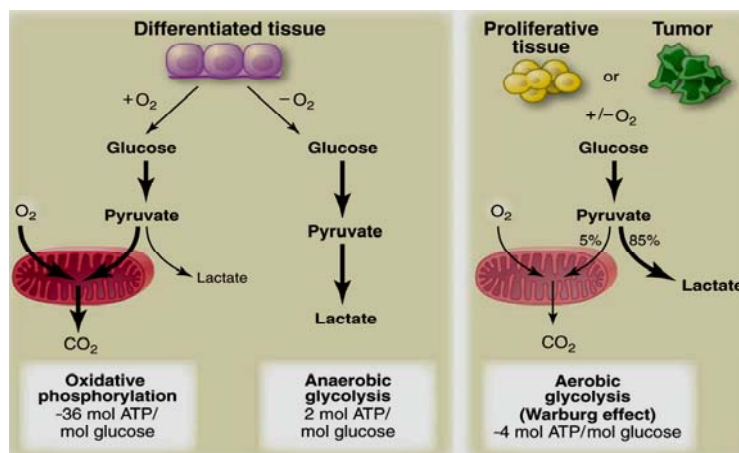


Figura 11. Representación esquemática de las diferencias entre fosforilación oxidativa, glucólisis anaeróbica, y glucólisis aeróbica (efecto Warburg). Extraído de (Vander Heiden *et al.*, 2009).

6.1. Efecto Warburg.

En 1956, Otto Warburg observó que las células tumorales metabolizaban la glucosa hacia producción preferencial de ácido láctico incluso en condiciones no hipóxicas (Figura 12). La glucosa es un sustrato metabólico muy importante para todas las células (normales o tumorales) que se utiliza en mayor o menor medida en numerosas funciones metabólicas. En las células tumorales el destino de la glucosa varía durante los distintos estadios del desarrollo del tumor (Herling *et al.*, 2011).

Los supresores de tumor y oncogenes más importantes tienen conexiones estrechas con las vías metabólicas. Alguna de las primeras evidencias de vínculos entre los oncogenes y la glucólisis aeróbica es la estimulación de la captación de glucosa por la activación de RAS y la habilidad de SRC para fosforilar numerosas enzimas glucolíticas. Además, según el tipo celular, SRC activa HIF1 α , la cual induce la glucólisis. El primer mecanismo descrito entre un oncogén activado y el metabolismo de glucosa alterado fue la activación transcripcional del lactato

deshidrogenasa A (LDHA) por MYC, el cual a posterior se demostró que activaba la mayoría de los genes de enzimas glucolíticas y de los transportadores de glucosa. Asimismo, MYC induce los factores de *splicing* que producen piruvato quinasa M2 (PKM2). PKM2, que convierte el fosfoenolpiruvato en piruvato, favorece la glucólisis aeróbica durante la transformación celular (Koppenol *et al.*, 2011).

El oncogén AKT, activado por la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), potencia la glucólisis a través de la activación de la hexoquinasa 2, la fosfofructoquinasa 1 (PFK1), la PFK2 y el reclutamiento de transportadores de glucosa a la superficie celular. A pesar de que las funciones de AKT son independientes de HIF1, también puede incrementar la actividad HIF1, para potenciar más la inducción de la glucólisis. La expresión ectópica de AKT o MYC induce la glucólisis aeróbica pero, a diferencia de MYC, AKT no incrementa la función mitocondrial asociada a la producción de energía acoplada a la fosforilación oxidativo (Koppenol *et al.*, 2011).

La activación de RAS se vinculó inicialmente con el incremento de transporte celular de glucosa, pero se ha descrito que el papel de RAS en el metabolismo es más complejo: (1) la activación de RAS facilita el importe de glucosa a través de la inducción de GLUT1, (2) las células transformadas con *KRAS* activado exhiben el efecto Warburg a través de una elevada conversión de glucosa a lactato, y (3) la activación de RAS puede inducir la actividad de MYC y potenciar los niveles de HIF1 en ausencia de hipoxia y por lo tanto, mediar los efectos del metabolismo a través de HIF1 o MYC (Koppenol *et al.*, 2011).

Existen diversos genes y proteínas de supresores de tumor que están implicados como moduladores de HIF1 α y que contribuyen al efecto Warburg; por ejemplo, *PTEN* (la pérdida de este supresor facilita la expresión de HIF1) o p53 (la asociación de ambos inhibe la transcripción estimulada por HIF1). De modo que la estabilización constitutiva de las HIFs contribuye al efecto Warburg y a la tumorigénesis (Koppenol *et al.*, 2011).

A pesar de que la p53 se ha descrito como “el guardián del genoma”, su función se extiende también a la regulación del metabolismo a través de la regulación transcripcional. La p53 *wild-type* estimula la respiración mitocondrial y suprime la glucólisis. TIGAR es una proteína reguladora de la glucólisis y de la apoptosis inducida por la proteína tumoral TP53. TIGAR tiene actividad fructosa 2,6-bifosfato y reduce la PFK1, suprime la glucólisis y favorece el aumento de producción de NADPH por la vía de la pentosa fosfato. Por consiguiente, la

pérdida de función de la p53 se relaciona con la inducción de la glucólisis aeróbica (Koppenol *et al.*, 2011).

Aunque la alteración oncogénica del metabolismo generalmente implica el efecto Warburg, la potenciación del flujo de glucosa a lactato es insuficiente para promover la replicación celular y otras vías metabólicas deben ser estimuladas para la replicación celular (Koppenol *et al.*, 2011):

- ✓ La glutamina contribuye con carbonos anabólicos y con otras piezas para las células en crecimiento. Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico de células en proliferación son moléculas híbridas de carbonos de glucosa y glutamina, donde esta última entra en el ciclo del ácido cítrico con la conversión, por las glutaminasas (GLS), a glutamato y después, por la glutamato deshidrogenasa o las aminotransferasas, a α -ketoglutarato. MYC induce genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y en el metabolismo de la glutamina, específicamente los que expresan transportadores de glutamina que incrementan el flujo de carbonos de glutamina. La inducción de la glucólisis aeróbica y del metabolismo de la glutamina por MYC proporciona a las células ATP, esqueletos carbonados y nitrógeno para la síntesis de ácidos nucleicos. Otro oncogén que induce la función mitocondrial para la transformación celular a través del metabolismo de la glutamina, es el RAS activado.
- ✓ La GLS2 es transactivada por la p53. El incremento de la conversión de glutamina a glutamato por la GLS2 promueve un incremento de la producción de glutatión, que atenúa los subproductos metabólicos como el peróxido de hidrogeno. De modo que, la p53 además de su función en el efecto Warburg, también tiene un papel en la homeostasis redox a través de la estimulación de la producción de NADPH por la vía de las pentosa fosfato y de la síntesis de glutatión por el incremento de GLS2.
- ✓ Otras alteraciones que favorecen la oncogénesis incluye la activación de los receptores tirosina quinasa; como el ErbB2, el cual estimula el importe de glucosa, la producción de NADPH por la vía de la pentosa fosfato y de la oxidación de los ácidos grasos, y consecuentemente elimina el estrés oxidativo.

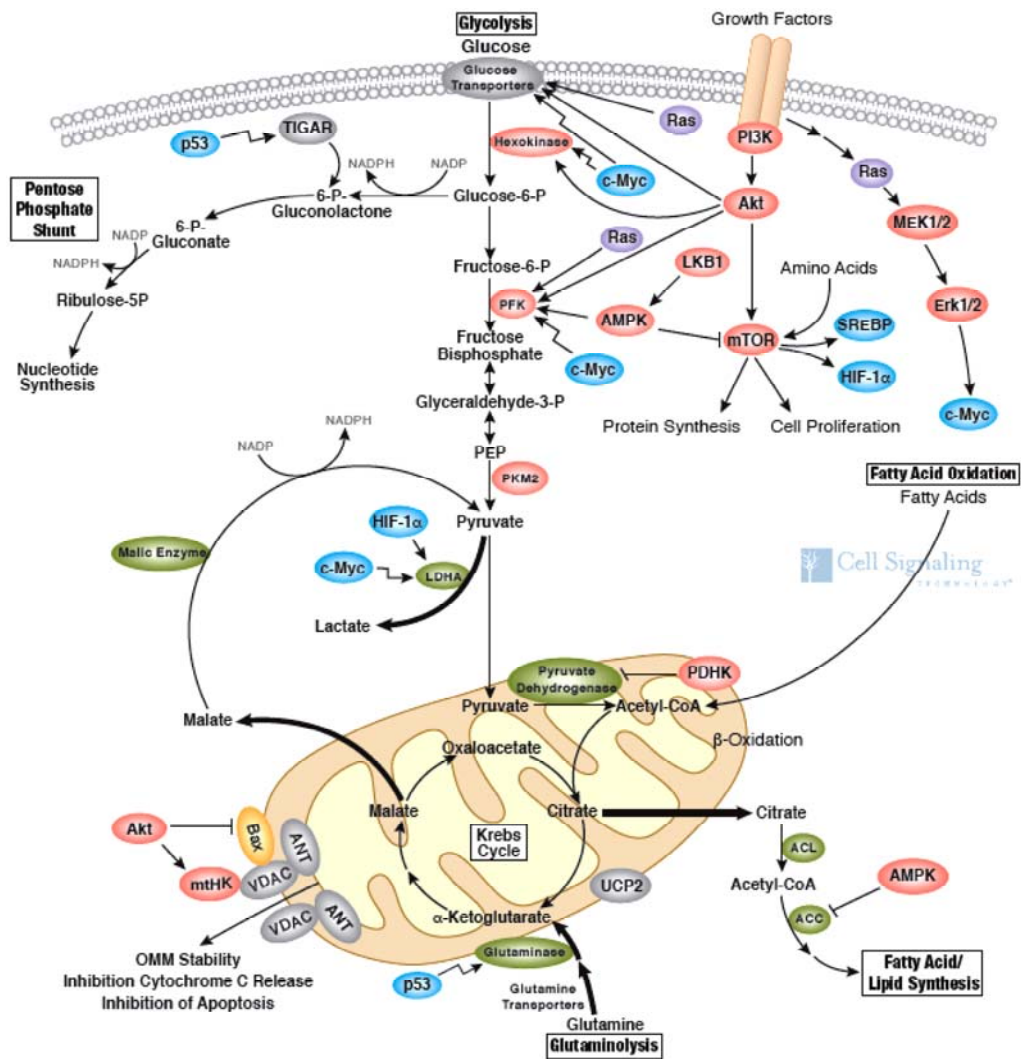


Figura 12. Vías de señalización y metabólicas asociadas al efecto Warburg. Extraído de *Cell Signaling Technology*.

Las células tumorales mezclan características de la gluconeogénesis y la glucólisis para dar lugar a un metabolismo especial que les confiere una ventaja selectiva sobre las células normales (Israel and Schwartz, 2011). A diferencia de las células normales, la mayoría de las células tumorales producen elevadas cantidades de lactato sin tener en cuenta la disponibilidad de oxígeno y por ello su metabolismo se suele referir como “glucólisis aeróbica” (Vander Heiden *et al.*, 2009) (Figura 11). Algunas de las hipótesis por las que los tumores adquieren o trabajan con la “glucólisis aeróbica” son (Herling *et al.*, 2011):

- ✓ *Metabolismo energético dividido en zonas en los tumores masivos.* En tumores masivos con vascularización baja o inexistente, la concentración de oxígeno decrece desde la periferia hacia el centro del tumor. Además, las células localizadas más cerca de los vasos sanguíneos exhiben fosforilación oxidativa, mientras las que están alejadas

generan principalmente su ATP a través de la glucólisis anaeróbica. De modo que el conjunto del tumor depende de la glucólisis aeróbica para la producción de energía.

- ✓ *Producción agresiva de lactato.* La acumulación de lactato en el microambiente del tumor está acompañado por una acidosis local que facilita la invasión del tumor a través de la destrucción de la población de células normales adyacentes o de la degradación inducida por el ácido de la matriz extracelular y la promoción de la angiogénesis. De modo que la producción de lactato aeróbico es usado por los tumores para ganar una ventaja selectiva sobre las células normales.
- ✓ *Atenuación de la producción de radicales citotóxicos.* La reducción de la producción de ATP mitocondrial puede disminuir la ratio de producción de ROS ya que la cadena respiratoria es el mayor productor de ROS.
- ✓ *Producción reforzada de piruvato.* El incremento de los niveles de piruvato podría contribuir a la disminución de los niveles de ROS, estando la producción de piruvato está enzimáticamente acoplada a la de lactato.

Hipótesis

La hiperactividad del EGFR confiere mal pronóstico. El EGFR se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de tumores, entre ellos el cáncer de colon, pulmón, páncreas y cabeza y cuello (HNSCC) Además la cooperación con otros miembros de la familia del EGFR, podría ampliar esta lista a otras neoplasias.

La radioterapia consigue, en un elevado porcentaje de casos, una buena respuesta. Sin embargo, la existencia de células resistentes a la radiación reduce el control tumoral. Una de las causas de la radioresistencia es la hiperactividad del EGFR.

En cáncer de cabeza y cuello (HNSCC), el bloqueo del EGFR con el anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab aumenta el control local y la supervivencia en pacientes tratados simultáneamente con radioterapia.

Estos hechos hacen que la inhibición del EGFR se perciba como una de las vías de progreso en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, no todos los pacientes tratados con cetuximab y radiación se benefician del tratamiento, lo que sugiere que, independientemente de la expresión del EGFR, existen mecanismos de resistencia a la combinación. Se han descrito distintas posibilidades de *by-pass* al bloqueo del EGFR. La complejidad de la vía de señalización sugiere que la topografía de la resistencia puede ser variada y múltiple. No obstante, cuanto más arriba de la vía de transmisión de señales se sitúe el *by-pass* mayor debería ser la resistencia debido a que un mayor número de funciones citoprotectoras se verían liberadas.

Una de las oncoproteínas que podría actuar de este modo es SRC, cuya actividad se relaciona con la progresión tumoral tanto en fases avanzadas como en lesiones premalignas. Además, SRC y EGFR comparten vías de señalización que promueven la progresión de la célula tumoral. En conjunto estos hechos sugieren que la inhibición de SRC podría aumentar la potencia antitumoral de la combinación de radioterapia y cetuximab.

La **hipótesis** de esta Tesis Doctoral es que el uso de inhibidores de SRC podría potenciar el efecto antitumoral de la combinación de radioterapia y cetuximab en tumores dependientes del EGFR, sobretodo en células resistentes a cetuximab.

Objetivos

Objetivo principal

Evaluar los efectos del tratamiento concomitante con radioterapia, cetuximab y dasatinib, y mejorar el conocimiento de los mecanismos biológicos involucrados.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y caracterizar un modelo resistente a cetuximab.
2. Evaluar si el tratamiento combinado de cetuximab y dasatinib aumenta la eficacia antitumoral de la radioterapia en:
 - a. Xenotumores dependientes del EGFR
 - b. Xenotumores resistentes a cetuximab
3. Explorar si el efecto antitumoral de los tratamientos se asocia a cambios (o mecanismos) en la ruta de señalización del receptor EGFR.
4. Determinar si los tratamientos modifican la proliferación celular, la angiogénesis tumoral y la síntesis del ADN.
5. Evaluar si el tratamiento con dasatinib modifica el proteoma.

Materiales y métodos

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Células A431.

En este trabajo hemos usado la línea celular A431, obtenida del banco de células ATCC (*American Type Cell Culture*, nº CRL-1555), que se estableció a partir de un carcinoma escamoso humano de vulva. Numerosos estudios focalizados en el bloqueo del EGFR se han realizado con esta línea celular debido a que sobreexpresa el EGFR, convirtiéndose en un buen modelo para el estudio de las terapias anti-EGFR (Janmaat *et al.*, 2003; Riesterer *et al.*, 2009; Schmidt-Ullrich *et al.*, 1997).

1.2. Células FaDu.

En este proyecto también hemos usado la línea celular FaDu, obtenida de la ATCC (*American Type Cell Culture*, nº HTB-43), la cual se estableció a partir de un carcinoma escamoso humano de la hipofaringe. Esta línea celular también se ha usado en muchos estudios centrados en el bloqueo del EGFR debido a que sobreexpresa el receptor de EGF, aunque en menor medida que las células A431 (Chen *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2010; Skvortsov *et al.*, 2011).

1.3. Condiciones de cultivo.

Ambas líneas celulares, A431 y FaDu, crecieron adheridas sobre plástico formando una monocapa de morfología epitelial. Las células se mantuvieron de forma rutinaria en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, BioWhittaker) suplementado con un 10 % de FBS (Suero fetal bovino, PAA Laboratories GmbH), 100 U/mL de penicilina (Gibco BRL Life Technologies), 100 U/mL de estreptomina (Gibco BRL Life Technologies) y 15 mM de HEPES (Invitrogen) en un incubador a 37°C y en una atmósfera saturada de vapor con una concentración de CO₂ del 5 %. Ambas líneas, se dejaron crecer, renovando el medio cada 3 o 4 días, hasta llegar a una confluencia del 90 %.

1.4. Disgregación de la monocapa.

Tras alcanzar la confluencia, los cultivos se disgregaron según el siguiente procedimiento. Las células de la monocapa se lavaron con PBS (*Phosphate buffered saline*, PAA Laboratories GMBH) y se incubaron con una solución de tripsina/EDTA con 500 mg/L de tripsina 1:250 y 200 mg/L EDTA (BioWhittaker) a 37°C durante 15-20 minutos en las células

A431 y durante 10 minutos en las células FaDu. Tras la disgregación, la reacción de la tripsina se detuvo añadiendo medio de cultivo completo a los discos, con una relación de volumen respecto la tripsina de 1:3. Con la ayuda de pipetas *Pasteur* de plástico, transferimos la suspensión celular a un tubo cónico estéril, guardando una pequeña alícuota a partir de la cual se realizó el recuento celular. A continuación, se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo completo para sembrar los nuevos subcultivos.

1.5. Recuento celular.

En este trabajo, el recuento de células se realizó de manera rutinaria mediante un hemocitómetro o cámara de *Neubauer* estándar con el objetivo de sembrar un número de células concreto, tanto en el mantenimiento del cultivo celular como en los distintos ensayos.

A partir de la alícuota obtenida en el proceso de disgregación de la monocapa, se realizó una dilución en PBS de modo que, se pudieran contar entre 50 – 100 células por cuadrante de la cámara de *Neubauer*. Las células vivas se observaron como esferas refringentes y claras en un microscopio invertido. El número de células por mL se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \text{promedio de células por cuadrante} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

Donde 10^4 es el factor de corrección de la cámara de *Neubauer*.

$$\text{Células totales} = (\text{Número de células/mL}) \times \text{volumen total de la preparación celular de donde se obtuvo la alícuota de recuento (tubo cónico)}.$$

1.6. Congelación y descongelación de células.

Para disponer de un stock de células con un número equivalente de pasajes se procedió a la técnica de la criopreservación. Las células se tripsinizaron siguiendo la metodología descrita en el punto 1.4 y, después de obtener un *pellet*, se resuspendieron en medio de congelación formado por un 90 % de FBS y un 10 % del agente crioprotector DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Sigma). Esta suspensión se dispuso en criotubos y se congeló en un arcón congelador hasta -80°C . El descenso de temperatura se realizó lentamente gracias a que los criotubos se alojaron en un recipiente con alcohol isoamílico. Pasadas 4 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido conectado a un sistema de seguridad electrónico de alarma.

Para descongelar los stocks, los criotubos con las células se sumergieron directamente en un baño a 37°C para inducir una descongelación celular rápida. A continuación, la suspensión celular se transfirió con la ayuda de una pipeta *Pasteur* a un disco de cultivo con medio completo preincubado a 37°C. Transcurridas 16 horas, cuando la gran mayoría de células se habían adherido, se realizó un cambio completo del medio del disco para eliminar la fracción de células muertas y el DMSO que se encontraban en el medio de congelación.

1.7. Detección de especies del género micoplasma en el cultivo celular.

La contaminación por *micoplasma sp* pasa visualmente inadvertida y puede afectar a los resultados experimentales. Para evitar esta fuente de confusión, realizamos de forma rutinaria la detección de micoplasma. Este test consiste en la detección del ADN de la bacteria en los sobrenadantes de cultivos confluentes en ausencia de antibióticos mediante la técnica de PCR usando los *primers* o cebadores *Mico-1* y *Mico-2* (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores usados para la detección de micoplasma.

Cebadores	Secuencia (5' → 3')
<i>Mico-1</i>	GGCGAATGGGTGAGTAACACG
<i>Mico-2</i>	CGGATAACGCTTGCGACTATG

2. TRATAMIENTOS. AGENTES USADOS

2.1. Radiación ionizante.

Las células fueron irradiadas (*in vitro* o *in vivo*) con fotones de 6 MV procedentes de un acelerador lineal usado para el tratamiento de pacientes (*Varian Clinac 600, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, US*) a una tasa de dosis de 2'7 Gy/min en el isocentro (Figura 13). El control de calidad de la dosimetría y subsiguiente irradiación de las muestras fue realizada y validada por el *Servei de Física Medica* y el *Servei d'Oncologia Radioterapica* del *Institut Català d'Oncologia del Hospital Duran i Reynals* (L'Hospitalet de Llobregat).



Figura 13. Acelerador lineal utilizado para irradiar células.

2.2. Ligando EGF.

El ligando EGF (EGF, Urogastrone; Sigma Aldrich) se adquirió en forma de polvo blanco. Dos miligramos del polipéptido se resuspendieron en ácido acético 10 mM para obtener una concentración del ligando de 10 mg/mL (stock). A partir de esta solución, se preparó una solución de trabajo, disuelta en PBS con 0'1 % de BSA (albúmina sérica bovina), a una concentración de 10 µg/mL a partir de la que se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. Ambos, el stock y la solución de trabajo, fueron almacenados y conservados a -20°C hasta el momento de su uso.

2.3. Los inhibidores anti-EGFR, cetuximab y AG1478.

Cetuximab (Erbix®[®], Merck KGaA) se obtuvo de la Farmacia del *Hospital Duran i Reynals*. El fármaco a una concentración de 5 mg/mL (33'33 µM) fue disuelto en medio, con o sin FBS, para obtener una solución de trabajo intermedia a una concentración de 6'6 µM a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. Ambos,

el fármaco y la solución de trabajo intermedia, fueron almacenados y conservados a 4°C hasta el momento de su uso.

El inhibidor AG1478 (*Tryphostin, 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline*; Sigma Aldrich) fue comprado en forma de polvo blanco. El fármaco se resuspendió en DMSO:metanol (1:1) a una concentración de 3'2 mM (stock). A partir de esta solución, se preparó una solución de trabajo disuelta en medio sin FBS, a una concentración de 3'2 µM a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. El stock del inhibidor y la solución de trabajo fueron almacenados y conservados en alícuotas, preservándolas de la luz, a -20°C hasta el momento de su uso.

2.4. El inhibidor anti-HER2, AG825.

El inhibidor AG825 (*Benzylidenecyanoacetamide, 4-Hydroxy-3-methoxy-5-(benzothiazolylthiomethyl)*; Calbiochem®, Merck KGaA) fue comprado en forma de polvo amarillo. Dos miligramos del producto se resuspendieron en DMSO a una concentración de 40 mM (stock). A partir de esta solución, se preparó una solución de trabajo disuelta en un medio sin FBS, a una concentración de 40 µM, a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. El stock y la solución de trabajo fueron almacenados y conservados en alícuotas, preservándolas de la luz, a -20°C hasta el momento de su uso.

2.5. Los inhibidores de la tirosina quinasa de SRC, dasatinib y PP2.

Dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825, *N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide, monohydrate*, Bristol-Myers Squibb Australia Pty Ltd) se compró en forma de polvo blanco en *LC Laboratories* (Woburn, MA, USA). El fármaco se resuspendió en DMSO a una concentración de 10⁶ nM, a partir de la cual fue diluido en medio, en presencia o ausencia de FBS, para dos concentraciones de trabajo intermedias, una de 10⁵ nM y otra de 10⁴ nM, a partir de las cuales se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. La sustancia diluida o en polvo se almacenó y conservó, preservándola de la luz, a -20°C, mientras que las soluciones de trabajo intermedias fueron almacenadas y conservadas, protegidas de la luz, a 4°C hasta el momento de su uso.

El inhibidor PP2 (AG1879, *4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine*; EMD chemicals, Calbiochem®, Merck KGaA) fue comprado en forma de polvo

blanco y diluido en DMSO para obtener una concentración de 1655 μM (stock) a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. El fármaco diluido (stock) fue almacenado y conservado en alícuotas a -20°C hasta el momento de su uso.

2.6. El inhibidor anti-JAK, pyridone 6.

Pyridone 6 (P6, DBI, 2-(1,1-Dimethylethyl)-9-fluoro-3,6-dihydro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinolin-7-one; EMD chemicals, Calbiochem®, Merck KGaA) fue comprado diluido en DMSO a una concentración de 10 mM. El fármaco se diluyó en medio sin FBS para obtener una concentración de 10 μM (solución de trabajo intermedia) a partir de la cual preparamos las concentraciones necesarias para cada experimento. El fármaco y la solución de trabajo fueron almacenados y conservados, preservándolos de la luz, a 4°C hasta el momento de su uso.

2.7. El inhibidor anti-cMet, PHA665752.

El inhibidor PHA-665752 ((3Z)-5-[[[(2,6-Dichlorophenyl)methyl]sulfonyl]-3-[[[3,5-dimethyl-4-[[[(2R)-2-(1-pyrrolidinylmethyl)1-pyrrolidinyl]carbonyl]-1H-pyrrol-2-yl]methylene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one hydrazide; Sigma Aldrich) fue comprado en forma de polvo amarillo. Cinco miligramos del fármaco se diluyeron en DMSO a una concentración de 5 mM (stock). Se preparó una solución de trabajo intermedia en medio sin FBS a una concentración de 5 μM a partir de la cual se prepararon las concentraciones necesarias para cada experimento. Ambos, el fármaco y la solución de trabajo intermedia, fueron almacenados y conservados, preservándolos de la luz, a 4°C hasta el momento de su uso.

Tabla 3. Resumen de los fármacos usados en el estudio.

Agente	diana	formato	Dilución stock	diluyente	Dilución intermedia
<i>Ligando EGF</i>	EGFR	Polvo	10 mg/mL	ácido acético 10 mM	10 $\mu\text{g/mL}$
<i>C225</i>	EGFR	Diluido	5 mg/mL	Excipientes comerciales ⁽¹⁾	6'6 μM
<i>AG1478</i>	EGFR	Polvo	3'2 mM	DMSO:Metanol (1:1)	3'2 μM
<i>AG825</i>	HER2	Polvo	40 mM	DMSO	40 μM
<i>DST</i>	SRC	Polvo	10 ⁶ nM	DMSO	10 ⁵ /10 ⁴ nM
<i>PP2</i>	SRC	Polvo	1655 μM	DMSO	-
<i>Pyridone 6</i>	JAK	Diluido	10 mM	DMSO	10 μM
<i>PHA665752</i>	cMET	Polvo	5 mM	DMSO	5 μM

(1) Cloruro de sodio, glicina, poli sorbato 80, ácido cítrico monohidrato, hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables.

3. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.1. Generación de una población celular resistente a cetuximab (R).

Al inicio de este trabajo, quisimos disponer de una población celular resistente a cetuximab. El motivo de este interés es la existencia de un elevado desconocimiento de los mecanismos de resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (Kruser and Wheeler, 2010) (a diferencia de los inhibidores de la TK). Disponer de modelos resistentes a estos anticuerpos nos permitiría desenmascarar nuevos mecanismos causantes de las resistencias, a la vez que nos ayudarían a encontrar nuevas dianas terapéuticas que sensibilicen (resistencia intrínseca) o re-sensibilicen (resistencia adquirida).

Como se verá más adelante, los hallazgos referentes a la combinación de cetuximab y dasatinib propiciaron un cambio en el curso de la investigación, que relegó nuestro interés por la población celular resistente a cetuximab.

Para generar células A431 y FaDu resistentes a C225, expusimos ambas líneas parentales (*wild-type*, WT) a dosis crecientes del anticuerpo durante 3 meses y medio. A partir de 30 nM, fuimos doblando las dosis cada 10 – 14 días hasta llegar a una dosis de 1.280 nM. Las células fueron expuestas a concentraciones de 30, 60, 120, 240, 480, 960 y 1.280 nM (Figura 14). En paralelo en todo el proceso se cultivaron células WT sin administrarles C225.

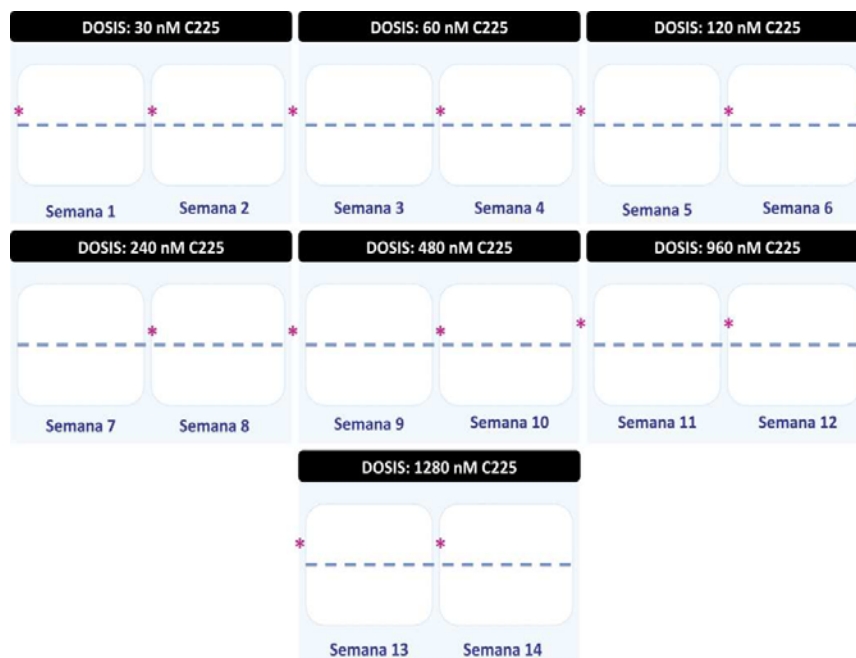


Figura 14. Esquema de la generación de células resistentes a C225. Cada cuadrante corresponde a 7 días, donde cada guión corresponde a un día. Los asteriscos marcan el momento en el que se disgregaron las células siguiendo el punto 1.4. Este esquema se aplicó con y sin cetuximab en paralelo.

Después de exponerlas a la última dosis, las líneas celulares con los fenotipos WT y resistente fueron criopreservadas. Las de fenotipo resistente las llamamos A431-R y FaDu-R.

3.2. Determinación *in vitro* del efecto citotóxico de los tratamientos.

La evaluación de la citotoxicidad se realizó mediante ensayos clonogénicos, de proliferación y de MTT.

3.2.1. Ensayo clonogénico.

Esta metodología evalúa la capacidad que tienen algunas células tumorales de originar una amplia familia de descendientes o colonia (> 50 células hijas) a partir de una sola célula madre. Aquellas células que forman colonias son consideradas supervivientes y la habilidad de una línea celular para formarlas nos da una idea de su potencial tumorigénico, en condiciones basales o tras recibir un tratamiento.

El método empleado fue el siguiente. Sembramos entre 1.000 y 2.000 células por disco de 21 cm² según los objetivos de cada experimento en particular. En este punto, consideramos que era importante realizar una buena tripsinización para evitar la formación de agregados y porque queríamos sembrar el mismo número de células en cada disco, independientemente de cual fuera el tratamiento, línea celular, etc. Durante 24 horas, se dejó que las células se adhirieran completamente antes de cambiar el medio completo por medio completo en ausencia o presencia de los tratamientos correspondientes. Tras la administración del tratamiento, se devolvieron los cultivos al incubador donde permanecerían durante 13 días más sin cambiarles el medio o moverlos del lugar donde se colocaron. Después de este período, las colonias fueron teñidas con el colorante cristal violeta (25 % de ácido acético glacial, en etanol y 1 % de cristal violeta) durante 10 minutos. El exceso de colorante fue lavado con agua del grifo. Tras identificar a simple vista las colonias, se contaron manualmente para determinar la eficiencia de clonación (CE) y supervivencia (SF) tras el tratamiento.

$$CE = \text{número de colonias contadas}^* / \text{número de células sembradas}^*$$

*(Sin tratamiento alguno)

$$SF = CE \text{ de las células tratadas} / CE \text{ de las células control}$$

3.2.2. Ensayo de proliferación.

Este ensayo evalúa la capacidad de proliferar de las células tumorales en ausencia o presencia de un tratamiento y mide en qué grado estos tratamientos inhiben o inducen la proliferación celular.

El método empleado se describe a continuación. Se sembraron 250.000 células, bien disgregadas, en discos de 21 cm² por duplicado. Durante 5 días se dejaron crecer. Tras lavar (PBS 1x) la monocapa, las células se cultivaron durante 0, 24, 48 y 72 horas en medio sin FBS al que se le añadieron los fármacos correspondientes. Se utilizaron medios sin FBS para eliminar los factores de crecimiento procedentes del medio de cultivo completo y para que las sustancias secretadas dependieran directamente de los fármacos administrados y de la duración del tratamiento. Después de este período, las células se tripsinizaron otra vez y se contaron según se ha mencionado en los puntos 1.4 y 1.5.

3.2.3. Ensayo de MTT.

El objetivo principal de esta técnica es determinar la actividad metabólica de las células en cultivo. El MTT (*Methylthiazoletetrazolium; Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; Sigma Aldrich*) es un compuesto que al ser reducido por las células produce *formazan*, un producto visible por un cambio de color en el sobrenadante. El cambio de color permite deducir la cantidad de células y por tanto el efecto sobre la viabilidad celular de un agente en concreto.

Procedimos del siguiente modo. Las células fueron sembradas en medio de crecimiento en placas de 6 pocillos a una densidad de 800 células por pocillo y por duplicado. Se cultivaron durante 5 días. Se lavaron (PBS) y se incubaron durante 48 horas en medio sin FBS al que se le añadieron los fármacos. Terminado el tratamiento, el sobrenadante de los pocillos se ajustó a un volumen de 1 mL por pocillo. Se añadieron 360 µL de la solución MTT (5 mg/mL) por pocillo y por mL de medio y se incubó a 37°C, preservándolo de la luz, durante 2 horas. Después de eliminar con precaución el medio, cada pocillo se resuspendió en 800 µL de DMSO para disolver los cristales de *formazan*. De cada pocillo, transferimos 100 µL por triplicado a una placa de 96 pocillos de la cual se midió la absorbancia usando el programa *KCjunior* en el espectrofotómetro *PowerWave XS* (BioTek) a una longitud de onda de 540 nm.

El porcentaje de citóstasis (equivalente a la muerte celular inducida por un tratamiento) se calculó con la ecuación formulada por *Singh* (*Singh et al.*, 1995):

$$\text{Citóstasis (\%)} = [1-(A/B)] \times 100$$

Donde A es la absorbancia de células tratadas y B es la absorbancia de las células control.

3.3. Determinación de los niveles de EGFR en la superficie celular por citometría de flujo.

Dado que a lo largo de este trabajo surgió la necesidad de evaluar los niveles de EGFR en la membrana plasmática, utilizamos la citometría de flujo como instrumento (UB-Bellvitge, Servicio técnico-científico). Determinamos los niveles de EGFR en las líneas celulares A431. Además usamos la línea celular JURKAT (ATCC, TIB-152TM; procedente de una leucemia aguda de células T) como control negativo del estudio debido a que no expresan EGFR. Para detectar el receptor, usamos C225 conjugado con FITC el cual fue generado por MERCK (Dr. Moyano, Barcelona) a una concentración de 1'8 mg/mL (stock).

En primer lugar, titulamos el anticuerpo conjugado para determinar la concentración que produce la mejor discriminación entre las células positivas y negativas. El anticuerpo a la concentración de partida (C225-FITC, stock) se centrifugó a 15.000 g y a 4°C durante 10 minutos, descartamos el sobrenadante. Se preparó el anticuerpo a una concentración de 300 µg/mL (*pellet*) y una serie de diluciones de éste (1'8, 0'675, 0'253, 0'094, 0'0356 y 0'013 µg/µL) en PBS. Preparamos suspensiones celulares de 5 millones para las células A431 y de 1'5 millones para las células JURKAT, las cuales fueron distribuidas en distintos tubos donde se prepararon 250.000 células A431 por tubo y 75.000 células JURKAT por tubo y se les añadió el mismo volumen de anticuerpo conjugado. Lo incubamos durante 15 minutos a 4°C. A continuación, a cada tubo se le añadió 3 mL de tampón ACK (1'5 M NH₄Cl, 100 mM NaHCO₃, 10 mM EDTA Na₂·2H₂O; pH 7'4), para evitar autofluorescencia debido a la fijación con formol y se centrifugó durante 3 minutos a 1.500 g y a 4°C. Se resuspendieron las células (*pellet*) en solución residual, se añadieron 200 µL de formol 2 % en PBS y se adquirieron 2.000 células diana usando el citómetro de flujo *BD FACSCalibur cell sorter* [software utilizado: *BD Cellquest Pro plus* (BD Biosciences Pharmingen) y *ModFit LT3.2* (Verity Software House, Topsham ME, US)]. El título adecuado de C225-FITC fue 1'8 µg/µL.

4. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.1. Estabulario y animales.

Se emplearon ratones atímicos Swiss nu/nu hembra de 6-8 semanas de edad y de un peso entre los 18 y 22 gramos (Harlan, Gannat, Francia). El estado microbiológico de los animales basado en las recomendaciones de la *Federation for Laboratory Science Associations* (FELASA), fueron certificados por la firma comercial. Los animales se estabularon a una temperatura de 20-22°C, en condiciones libres de patógenos en el estabulario del *IDIBELL-Hospital Duran i Reynals* (acreditación AAALAC #1155). Se les administró comida y bebida estéril *ad limitum*. Los criterios de punto final fueron: a) tumor mayor a un tamaño de 1'5 cm³, b) pérdida de peso superior a un 20 % o signos de enfermedad o c) que al haber llegado al resultado esperado en el experimento, proseguirlo no aportaría ningún beneficio. En este punto, los animales fueron sacrificados por sobredosis de barbitúrico (inyección intraperitoneal de 100 µL de pentobarbital sódico equivalente a 4'5 mL/kg procedente de una solución de pentobarbital a 200 mg/mL). Los xenoinplantes se procesaron cuando fue necesario para estudios bioquímicos e histológicos. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados de acuerdo con las guías para el cuidado animal y ética IDIBELL, y sancionados por el *Departament de Medi Ambient* de la *Generalitat de Catalunya*.

4.2. Generación de tumores en ratones atímicos.

En condiciones de asepsia, se inyectaron 1 x 10⁶ millones de células resuspendidas en 100 µL medio DMEM completo en el tejido subcutáneo. Cuando fue preciso irradiar los tumores, se inyectaron en la pata derecha posterior, si no se prefirió la región periescapular. En algunos experimentos, se transplantaron fragmentos tisulares procedentes de xenoinplantes en el tejido subcutáneo como se muestra en la Figura 15.

La inyección de células en el tejido subcutáneo se realizó con precisión, tanto en cuanto al volumen inyectado como al área dónde se inyectaron las células con el fin de asegurar un crecimiento homogéneo de los tumores. Para ello los ratones fueron anestesiados. Se les administró intraperitonealmente (i.p.) 1 mL/kg de las siguientes sustancias: ketamina (solución de 50 mg/mL) y medetomidina (solución de 1 mg/mL), y 5 mg/mL de atipamezol para revertir los efectos de la anestesia.

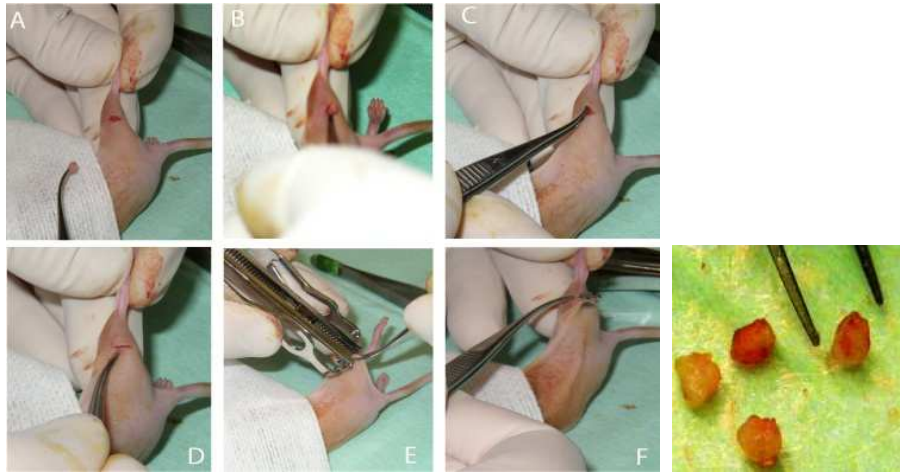


Figura 15. Trasplante de fragmentos tumorales en ratones atímicos. Se realizó una pequeña incisión en la piel de los ratones (A) en la cual se introdujo el fragmento tumoral de 1–2 mm³ (B y C). Aproximamos la piel de cada lado de la incisión (D) y le colocamos una grapa para suturar la incisión y asegurar su implante (E y F). En la fotografía de la derecha, fragmentos tumorales antes de ser trasplantados.

4.3. Método para la irradiación de tumores xenoinplantados en ratones.

Para llevar a cabo esta parte de nuestro estudio fue necesario poner a punto y validar un método de irradiación (Baro *et al.*, 2012). El procedimiento que implementamos cumplió los siguientes criterios, que consideremos esenciales: primero, minimizar la irradiación de tejidos sanos por lo que se implantaron los tumores en la pata posterior derecha de los animales (irradiación focalizada); segundo, cumplir los principios estándares de irradiación para el tratamiento de humanos, entre ellos aplicar la radiación con un fraccionamiento equivalente al empleado en clínica; tercero, reducir el tiempo en que los animales están fuera del estabulario, minimizar el riesgo de infección, incrementar la eficiencia irradiando diversos ratones al mismo tiempo y, finalmente, generar un método fácil de reproducir diariamente.

La metodología que se llevó a cabo para irradiar los ratones y la evaluación de la eficiencia de este método se describe en los resultados (punto 2.2.2.).

4.4. Monitorización del crecimiento tumoral.

El crecimiento de los tumores se determinó dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$V = [(\text{diámetro largo}) \times (\text{diámetro pequeño})^2] \times \pi/6$$

Para cuantificar con más precisión las variaciones en el crecimiento tumoral inducidas por el tratamiento, representamos cada curva de crecimiento por separado en un eje de coordenadas cartesianas. Esto nos permitió conocer para cada tumor el momento en que se lograba un determinado volumen para, finalmente, realizar la estadística correspondiente.

4.5. Procesado de las muestras tumorales.

Cuando fue necesario obtener muestras de xenoimplantes se procedió a sacrificar los ratones. Los tumores fueron extirpados y destinados para muestras de histología, bioquímica y molecular. Para estudios histológicos, una parte del tumor se fijó durante 24 horas en formaldehído al 4 % para después incluirla en parafina, la otra parte se congeló en medio OCT (<11% de alcohol polivinílico, <5 % de cera carbónica y <85 % de ingredientes no reactivos) a -80°C. La fracción restante del tumor se almacenó directamente en criotubos a -80°C para la extracción de ácidos nucleicos o proteínas.

5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

5.1. *In vitro*.

Los estudios se realizaron en las líneas celulares, A431 y FaDu. Las células se sembraron sobre cubreobjetos, previamente flameados, y colocados en el interior de discos 21 cm². Cuando fue necesario los cubreobjetos se almacenaron a 4°C con PBS en azida sódica al 1 % (máximo 4 días).

5.1.1. Inmunofluorescencia para la cuantificación de BrdU: síntesis de ADN.

La Bromodesoxiuridina (BrdU) es un nucleótido sintético análogo de la timidina, de fórmula molecular C₉H₁₁BrN₂O₅. Se trata de un nucleótido con un átomo de bromuro en el quinto carbono de la base pirimidínica cuya analogía con la timidina permite una substitución casi total de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis de ADN.

Se procedió a la inmunodetección de células BrdU (+) tratadas en cultivo con 10 µM de BrdU durante 10 minutos. Tras esta incubación, las células se fijaron con formol tamponado al 4 % durante 10 minutos, fueron lavadas con agua destilada y con PBS. Las membranas celulares se permeabilizaron con 0'1 % tritón X-100 en PBS durante 10 minutos. Se desnaturalizó el ADN mediante la incubación de las muestras con 2N HCl a 37°C durante 1 hora. A continuación, se neutralizó el ácido con dos lavados de 5 minutos cada uno con borato 0'1M (pH 8'5). Se efectuó un bloqueo antigénico con suero de caballo al 5 % y con suero de cabra al 5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo primario anti BrdU (Tabla 4) durante 1 hora a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con 0'1 % tritón X-100 en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondientes (Tabla 4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, montamos los cubres sobre portaobjetos en un medio *anti-fading Vectashield* (Vector Laboratorios Inc.). Para visualizar el núcleo celular empleamos DAPI o TOPRO3 (dilución 1:1000).

Se evaluaron las preparaciones con un objetivo de bajo aumento (10x) y se seleccionaron las 6 áreas con un mayor número de células BrdU (+). Se procedió a capturar las imágenes con un microscopio *NIKON Eclipse 80i* de fluorescencia equipado con una cámara acoplada y con el software *Nis Element BR 3.2*. La cuantificación del marcaje se realizó mediante el software *Image J*, que se puede encontrar en la web www.rsb.info.nih.gov/ij/. Se contaron los núcleos de las células positivas respecto el total de núcleos en cada campo. El

recuento se llevó a cabo sin conocer el tratamiento previo que habían recibido las células. El índice BrdU (o porcentaje de BrdU positivas) se determinó a partir de la proporción de células BrdU positivas respecto el número total de núcleos.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios usados para la inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Tipo	Casa Comercial	Origen	Dilución de trabajo
BrdU	Primario	AbD Serotec	Rata	1:500 o 1:1000
Alexa fluor 488 anti-rat	Secundario	Molecular Probes	Conejo	1:1000

5.2. *In vivo*.

Los estudios histológicos *in vivo* fueron realizados a partir de tumores congelados en OCT o incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones de 3 μm que fueron colocados en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina al 10 %. Los portaobjetos con muestras de OCT se expusieron durante 10 minutos a temperatura ambiente para secarlos y finalmente almacenarlos a -80°C hasta el momento de su uso. Los portaobjetos con muestras de parafina se incubaron a 37°C para que se pegaran bien y finalmente almacenarlos a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

5.2.1. Tinción hematoxilina-eosina.

La hematoxilina de Harris es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Con esta técnica histológica, se tiñen los núcleos de azul, los citoplasmas en rosa, el músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, los glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Se realizó un desparafinado de los cortes con xilol durante 40 minutos y una posterior hidratación mediante baños sucesivos en alcoholes de concentración decreciente (alcohol absoluto, de 96° , de 70° y de 50°). Después del último alcohol, se lavaron los cortes durante 5 minutos con agua destilada y se incubaron con hematoxilina durante 10 minutos. Se lavaron con agua del grifo. Se sumergieron en HCl al 1 % hasta que la hematoxilina viró de color a una tonalidad más rojiza. A continuación, se sumergieron en agua amoniacal (agua con un pequeño volumen de amoníaco al 30 %) hasta que los cortes viraron a una tonalidad azul. Después de un lavado con agua del grifo, se inició la tinción con eosina durante 1 minuto seguida de una deshidratación en una batería de etanoles de menor a mayor graduación (50 , 70 , 96° y absoluto) y una posterior incubación en xilol de 40 minutos. El montaje se realizó con un

medio de resina sintética DPX (ftalato de dibutilo, BDH). La evaluación histológica y el diagnóstico de las muestras fue realizada por el Dr. August Vidal del *Departament de Patologia del Hospital de Bellvitge*.

5.2.2. Inmunofluorescencia para la cuantificación de BrdU: síntesis de ADN.

Se inyectó a los ratones una dosis de 50 mg/kg BrdU vía i.p. 1 hora antes de la obtención de la muestra tumoral y su congelación en OCT. Se procedió a fijar y al bloqueo antigénico según el método descrito en el punto 5.1.1., excepto que la desnaturalización del ADN con ácido fue tan solo de 20 min. Después se incubó el tejido tumoral con el anticuerpo primario (Tabla 4) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 4), el montaje de las preparaciones y la cuantificación de las células según el método señalado en el punto 5.1.1.

5.2.3. Inmunohistoquímica para la cuantificación de CD31/PECAM: angiogénesis.

El antígeno CD31/PECAM-1 es una proteína de membrana integral de 130 kDa que participa en la adhesión célula-célula y es un marcador específico para células endoteliales maduras, las cuales cubren las paredes de los vasos sanguíneos.

Se procedió a la detección de CD31 con la fijación de los cortes de OCT según se ha descrito en el punto 5.1.1. A continuación, se inhibieron las peroxidasa endógenas incubando las muestras durante 10 minutos con agua oxigenada al 3 % (67 % de PBS 1x, 30 % de metanol y 3 % de agua oxigenada). Posteriormente, se lavaron con agua destilada y con 0'1 % tritón X-100 en PBS, se bloquearon según se ha descrito en el punto 5.1.1 y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 5) y el anticuerpo secundario biotilnado (Tabla 5), ambos durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios usados para la inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Tipo	Casa Comercial	Origen	Dilución de trabajo
CD31/PECAM-1	Primario	BDPharmigen	Rata	1:50
Anti-rat biotilnado	Secundario	Dako	Conejo	1:200

Tras el marcaje, las preparaciones fueron incubadas con estreptoavidina y peroxidasa biotilnada usando el kit *StreptABComplex/HRP* (DaKo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El revelado se realizó a través de un sistema con cromógeno, diaminobenzamidina

(DAB) y agua oxigenada, el cual cuando es oxidado forma un producto final de color marrón en la zona diana del antígeno. A continuación, realizamos una tinción de hematoxilina para contrastar los marcajes celulares de las tinciones y una deshidratación de los cortes en una batería de etanoles de menor a mayor graduación y acabando con los xiloles. El montaje se realizó con un medio de resina sintética DPX (ftalato de dibutilo, BDH).

La cuantificación se realizó mediante el método descrito por Weidner y colaboradores (Weidner *et al.*, 1991) usando un microscopio óptico en las regiones tumorales que muestran un mayor número de capilares. Después de examinar la muestra con un objetivo de bajo aumento (10x), seleccionamos las 5 áreas con un mayor número de vasos sanguíneos teñidos. En cada una de estas áreas y usando un objetivo de mayor aumento (40x), se procedió a capturar las imágenes con un microscopio *NIKON Eclipse 80i* de fluorescencia equipado con una cámara acoplada y con el software *Nis Element BR 3.2*. Consideramos vasos sanguíneos aquellas estructuras con luz en su interior, con una única célula teñida y con un conjunto de células teñidas. La cuantificación de la densidad vascular se llevó a cabo sin saber en ningún momento el tratamiento previo que habían recibido los tumores mediante la inspección directa des del microscopio.

6. ESTUDIOS SOBRE PROTEINAS

6.1. *Western blot*.

Para explorar los cambios inducidos por los tratamientos en las proteínas implicadas en las vías de señalización utilizamos la técnica del *Western blot*.

6.1.1. Extracción de proteínas *in vitro* e *in vivo*.

Se obtuvieron proteínas procedentes de cultivos celulares o de tumores. En el caso de los cultivos celulares, se sembraron entre 250.000 y 500.000 células por disco de 21 cm² en medio completo. En el de los tumores, las proteínas se obtuvieron directamente de fragmentos tumorales, siendo la proporción para A431 de 9'5 ± 0'5 mg/mL y para FaDu de 6'1 ± 0'3 mg/mL.

Toda la extracción proteica se llevó a cabo en hielo. Antes de lisar las células en cultivo, éstas se lavaron dos veces con PBS, luego las incubamos durante 10 minutos con 0'5 mL/disco de 21 cm² de tampón RIPA (0'5 % sodio deoxicolate, 1 % NP40, 0'1 % SDS y 98 mL PBS) al que se le añadió, antes de su uso, los inhibidores de las fosfatasa (PMSF 1 nM, aprotinina 0'002 µg/mL, leupetina 0'005 µg/µL, benzamidina 0'1 µg/µL y pepstatina 0'001 µg/µL) y de las proteasas (NaF 0'001 M, β-glicerol fosfato 0'04 M y ortovanadato 0'1 M). Para la extracción proteica en los tumores se preparó 1 mL de la solución RIPA con los inhibidores de fosfatasa y proteasas, la mitad del volumen de RIPA preparado se añadió al politrón donde se había colocado, previamente, la pieza de tumor que queríamos lisar, homogeneizamos el tejido y transferimos todo el volumen a un *ependorff*. Este proceso lo repetimos otra vez con la otra mitad de volumen de RIPA preparado para recuperar la máxima cantidad posible de proteína del tejido. En uno u otro caso, el disgregado obtenido se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, dos veces, y el sobrenadante se utilizó para la técnica de *Western blot*.

6.1.2. Cuantificación proteica.

La cuantificación de la concentración de proteínas en el sobrenadante de los lisados celulares y de las muestras *in vivo* se realizó, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el kit *BCA protein assay kit* (Pierce Biotechnology), el cual consiste en un detergente basado en el ácido bicinconínico (BCA) para la detección colorimétrica y cuantitativa de proteína total. Este método combina la reducción por proteína de Cu²⁺ a Cu¹⁺ en un medio alcalino (reacción de

Biuret) con la detección selectiva del catión de cobre Cu^{1+} usando un único reactivo que contiene el BCA. En una placa de 96 pocillos, añadimos 200 μL por pocillo de la solución de trabajo del kit (La solución B se diluye 1:50 en la solución A; Tabla 6), 7 μL (para las muestras o recta patrón) o 10 μL (para el blanco) del buffer de lisis o agua estéril y 3 μL de muestra o recta patrón. Incubamos la placa durante 30 minutos a 37°C y, inmediatamente, leímos la placa usando el programa *KCjunior* en el espectrofotómetro *PowerWave XS* (BioTek) a una longitud de onda de 540 nm.

Tabla 6. Descripción de los reactivos del *BCA Protein Assay Kit*.

Reactivos	Contenido
<i>Solución A</i>	Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconíico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0'1 M (500 mL)
<i>Solución B</i>	sulfato cúprico al 4 % (25 mL)

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y en todas las cuantificaciones incluimos, también por triplicado, una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) para extrapolar la concentración de proteínas de todas las muestras. Las concentraciones conocidas de BSA que usamos, fueron 0 o blanco, 0'0625, 0'125, 0'250, 0'5, 1 y 2 mg/mL y fueron preparadas a partir de un stock de BSA (a 2 mg/mL) el cual fue diluido en solución de lisis o agua estéril. Mantuvimos la misma solución que las muestras, para reducir la variabilidad de las muestras en la cuantificación.

Las proteínas celulares se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80°C para largo plazo o a -20°C en caso de que fueran a usarse en las próximas semanas.

6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las muestras (cada una procedente de una condición experimental determinada) se disolvieron en tampón de carga 4x (0'25 M Tris HCl pH 6,8, 0'3 M SDS, 40 % glicerol, 0'01 % de azul de bromofenol y 5 % β -mercaptoetanol en agua destilada). Se desnaturalizaron las proteínas a 95°C durante 5 minutos. En cada carril (condición experimental) del gel de electroforesis se cargó la misma cantidad de proteínas (45-50 μg por muestra).

La electroforesis se realizó sobre un soporte de acrilamida SDS-PAGE que separa proteínas según su movilidad electroforética, que viene dada principalmente por su peso molecular. El detergente aniónico SDS desnatura las proteínas y les confiere una carga negativa en una proporción de carga/masa uniforme. De esta forma la distancia de migración

depende del tamaño de la proteína. Utilizamos dos tipos de geles de acrilamida/bisacrilamida (29:1), el gel preparador o superior y el gel separador o inferior. El gel preparador lo usamos para concentrar todas las proteínas en una estrecha banda para que entren en el gel separador al mismo tiempo, lo que incrementa la resolución de la separación electroforética de las proteínas. En primer lugar, preparamos el gel separador (el % de acrilamida de este gel puede variar en función del peso molecular de las proteínas de interés, concretamente, en este estudio se usó un gel al 9 % ya que se buscó trabajar en un rango de peso molecular de 20 a 200 KDa). Para activar la polimerización, añadimos 1 % APS y 0'1 % TEMED. Después de polimerizar, añadimos el gel preparador al 4 % de acrilamida, 1 % APS y 0'1 % TEMED. Finalmente, los geles se sumergieron en cubetas *BioRad* con tampón de electroforesis (25mM Tris pH 8'6, 0'1 M glicina i 0'1 % SDS), se cargaron las muestras en los pocillos del gel y se dejó correr la electroforesis a 100 – 150 V. Cuando el frente de migración alcanzó la parte inferior del gel se detuvo la alimentación y se procedió, rápidamente, al montaje de la transferencia.

6.1.4. Transferencia de proteínas.

Las proteínas fueron transferidas desde el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane*) mediante un campo eléctrico. Los montajes de la transferencia o “sándwich” se realizaron en soportes de plástico *BioRad* donde, siguiendo este orden, se colocó una esponja *scotch brite*, 2 papeles *whattman*, el gel de acrilamida en contacto con la membrana de nitrocelulosa, otros 2 papeles *whattman* y una última esponja. La transferencia se realizó a 100 V durante 90 minutos en frío y en tampón de transferencia (25mM Tris pH 8'6, 0'1 M glicina y 10 % metanol).

6.1.5. El bloqueo de epítomos inespecíficos.

Terminada la transferencia, las proteínas ya fijadas en las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche desnatada al 5 % diluida en TBS 1x (1 M Tris, 0'3 M cloruro sódico) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente para evitar uniones antígeno-anticuerpo inespecíficas. Finalmente las membranas, se lavaron durante 6 minutos con TBS 1x en 0'1 % tritón X-100 (3 veces).

6.1.6. Detección inmunológica con anticuerpos específicos.

Este paso se realizó con la incubación de un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario y la detección de la señal.

6.1.6.1. Anticuerpo primario.

Los anticuerpos primario fueron preparados en BSA 1 % - TBS o leche 1 % – TBS. En caso necesario, para preservar los anticuerpos primarios se añadió azida sódica al 1 %. Las membranas fueron incubadas toda la noche en agitación y a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 7). Al día siguiente, los anticuerpos se recuperaron y las membrana se lavaron durante 6 minutos, tres veces, con 0'1 % tritón X-100 en TBS.

Tabla 7. Anticuerpos primarios para el Western blot.

Anticuerpo	Peso molecular	Casa Comercial	Origen	Solvente	Dilución de trabajo	Dilución del secundario	Revelado
pEGFR Y845	170 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y1101	180 KDa	ECM Bioscience	Ratón	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y1068	170 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y1086	~ 185 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y992	~ 185 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y1173	170 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pEGFR Y1148	170 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
EGFR total	170 KDa	Sigma Aldrich	Ratón	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
pSRC Y418	60 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
pSRC Y529	60 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	BSA	1:5000	1:5000	ECL
SRC total	60 KDa	Cell signaling	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
pCORTACTINA Y466	80, 85 KDa	St. Cruz Biotechnology	Conejo	BSA	1:200	1:1000	ECL plus
CORTACTINA total	75, 85 KDa	Sigma Aldrich	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
pERK 1/2	42, 44 KDa	Sigma Aldrich	Ratón	LECHE	1:5000	1:1000	ECL
ERK 1/2 total	42, 44 KDa	(Vinals <i>et al.</i> , 1999)	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
pAKT S473	60 KDa	Cell signaling	Conejo	BSA	1:500 o 1:1000	1:1000	ECL plus
AKT total	60 KDa	Cell signaling	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL
pSTAT3 Y705	79, 86 KDa	Cell signaling	Conejo	BSA	1.1000	1:1000	ECL plus
pSTAT3 S727	86 KDa	Cell signaling	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL plus
STAT3 total	79, 86 KDa	Cell signaling	Conejo	BSA	1:1000	1:1000	ECL
pCAVEOLINA Y14	24 KDa	BD Biosciences	Ratón	BSA	1:500	1:1000	ECL plus
CAVEOLINA total	22 KDa	BD Biosciences	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL

GLUT 1	55 KDa	Abcam	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL plus
p- p70 S6 T389	70, 85 KDa	Cell signaling	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
p70 S6 total	70, 85 KDa	Cell signaling	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL
c-MYC	62, 64 KDa	Sigma Aldrich	Ratón	BSA	1:500	1:1000	ECL Plus
HIF 1 α	115 KDa	(Brondello <i>et al.</i> , 1997)	Conejo	LECHE	1:1000	1:1000	ECL

6.1.6.2. Anticuerpo secundario.

Después de los lavados, las membranas fueron incubadas durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (Tabla 8). Los anticuerpos secundarios fueron preparados en leche 1 % – TBS y no se reutilizaron.

Tabla 8. Anticuerpos secundarios usados para el Western blot.

Anticuerpo	Casa Comercial	Origen	Solvente
Anti-Rabbit HRP	Amersham, GE Healthcare	Asno	Leche
Anti-mouse HRP	Amersham, GE Healthcare	Oveja	Leche

Finalmente, las membranas fueron lavadas durante 6 minutos, 3 veces, con 0'1 % tritón X-100 en TBS.

6.1.6.3. Detección de la señal.

A continuación, se detectó la presencia de las proteínas específicas en la membrana de nitrocelulosa con un método de revelado quimioluminiscente no radioactivo basado en la oxidación del luminol contenido en el líquido revelador por la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario. Para uniones proteína-anticuerpo con señal fuerte usamos el revelador *ECL Western blotting detection reagents and analysis systems* (Amersham Biosciences) y para las proteínas con baja señal usamos *ECL plus Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences). La emisión de luz fue detectada con una exposición de entre 0 y 5 minutos con películas de autorradiografía sensibles a la luz azul (*Hyperfilm ECL, high performance chemoluminescence film*, Amersham Biosciences).

6.1.7. Controles de carga.

Para determinar si cada pocillo fue cargado con la misma cantidad de proteína se usaron anticuerpos específicos contra proteínas estructurales cuya presencia no se modifica

por cambios en la señalización celular (Tabla 9). Usamos la tubulina (*in vitro*) o la vinculina (*in vivo*) como control de carga de las proteínas totales de la electroforesis.

Tabla 9. Anticuerpos primarios para el control de carga o de separación de fracciones.

Anticuerpo	Peso molecular	Casa Comercial	Origen	Solvente	Dilución de trabajo	Dilución del secundario	Revelado
α – tubulina	55 KDa	Sigma Aldrich	Ratón	Leche	1:5000	1:5000	ECL
Vinculina	116 KDa	Sigma Aldrich	Ratón	Leche	1:1000	1:1000	ECL

6.1.8. Análisis y cuantificación de las imágenes.

Las películas fueron escaneadas con un escáner *EPSON Perfection 1250* y editadas con el software *Adobe photoshop CS4* (Adobe Systems Inc.). Se cuantificó el nivel de oscurecimiento de las películas (bandas), que guarda linealidad con los niveles de proteína, con el programa informático *Quantity One* (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA).

6.2. Secreción del VEGF.

Se determinaron los niveles de VEGF para evaluar la secreción de VEGF.

6.2.1. Tratamientos de los cultivos y generación de las muestras.

Sembramos un millón de células A431 o FaDu por condición en discos de 21 cm² en medio completo y se incubaron durante 24 horas. Después de dos lavados con PBS, sustituimos el medio completo por medio sin FBS e incubamos los cultivos durante 24 horas más. A continuación, se administraron los tratamientos y los cultivos se incubaron durante 0, 24 o 48 horas hasta obtener el sobrenadante (1 mL), en el que las células habían secretado VEGF. Se realizó un recuento del número total de células por condición experimental para normalizar los valores de VEGF en función del número de células. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C.

6.2.2. ELISA.

Se cuantificó el VEGF secretado en el medio con el kit *Quantikine Human VEGF ELISA kit* (R&D Systems). El sobrenadante se diluyó en medio de cultivo, en una dilución 1:20 para las muestras de células A431 y en una dilución 1:10 para las muestras de células FaDu, a un volumen final de 200 μ L.

Usamos las placas de 96 pocillos del kit cubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para VEGF-A humano. Incubamos la placas durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir que el VEGF-A se uniera al anticuerpo inmovilizado en los pocillos. Después de lavar 3 veces, añadimos 200 μ L de anticuerpo anti-VEGF conjugado con peroxidasa y lo incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, lavamos las placas 3 veces y la incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente con 200 μ L de tetrametilbenzamina. Esta sustancia reacciona colorimétricamente con la peroxidasa, por eso es necesario incubarla en la oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 50 μ L de la solución *Stop* y se procedió a la lectura de la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm.

En cada experimento de ELISA, establecimos una curva patrón siguiendo las instrucciones del fabricante, que fue desde 0 hasta 2000 pg de VEGF-A/mL, para extrapolar los valores absolutos de las muestras. Todas las muestras y los distintos puntos de la curva patrón fueron cuantificados por duplicado y se calculó el promedio de todas las réplicas.

6.3. Determinación de la actividad GTPasa de RAS.

Las proteínas de la familia RAS, existen en dos formas intercambiables: la forma inactiva asociada al dinucleótido guanosín difosfato (GDP) y la forma activa asociada a guanosín trifosfato (GTP). Una señal *upstream* estimula la disociación del GDP de la forma inactiva que es seguida por la unión a GTP, que a su vez inducirá un cambio conformacional y funcional de los efectores unidos a RAS (v.gr. B-RAF). La forma de unión GTP se convierte por la acción intrínseca de la actividad GTPasa en la forma unida GDP, la cual libera los efectores *downstream*, logrando así, un ciclo de activación e inactivación donde RAS actúa como un interruptor molecular que transduce la señal *upstream* a los efectores *downstream*. El intercambio de GDP/GTP es una reacción lenta, que se convierte en rápida al ser estimulada por el factor intercambiador de nucleótidos guanosín (GEP), la actividad del cual se regula en una posición *upstream*. El GEP interacciona con la forma unida GDP, libera el GDP unido en forma de complejo binario (GEP+RAS) y, a continuación, el GEP se sustituye por el GTP para obtener la forma activa RAS-GTP (Takai *et al.*, 2001).

6.3.1. Tratamiento de los cultivos y generación de las muestras.

Se sembraron 250.000 células por disco de 21 cm² en medio de crecimiento. Las células se cultivaron durante 5 días, se lavaron (PBS) y se sustituyó el medio de crecimiento por medio

sin FBS. A continuación, las células se sometieron a los tratamientos para evaluar la actividad de la proteína RAS.

6.3.2. Ensayo de RAS-GTP y Western blot de RAS total.

El kit *Ras activation assay* (lote #32019, Upstate Millipore, Temecula, CA) se usó siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo utiliza la precipitación por afinidad para aislar de los extractos celulares las moléculas de RAS unidas a GTP, equivalente a la proteína RAS activada.

El primer paso realizado fue seguir el método de extracción proteica mencionado en la sección 6.1.1., con algunas modificaciones. Para lisar las células se usó la solución MLB 1x (1 mL de la solución comercial MLB 5x diluida en 4 mL de agua destilada con 10 % de glicerol) con los inhibidores de fosfatasa y proteasas (50 μ L de PMSF, 250 μ L de NaF, 50 μ L de ortovanadato; aprotinina, leupeptina, benzamidina, β -glicerol fosfato y pepstatina se añadieron a la misma concentración que con la solución de lisis RIPA). Inmediatamente después de añadir la solución de lisis, se levantó la monocapa celular de los discos con *scrappers* y la suspensión se transfirió a tubos *ependorf*. Todos los *ependorfs* se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recogieron y transfirieron a nuevos *ependorfs* a partir de los cuales se prepararon las muestras del lisado celular (45 μ g de proteína total) para la técnica de *Western blot*.

Para obtener las muestras de *pull-down*, se usaron 400 μ g de proteína total de cada muestra y línea celular. En este paso, consideramos importante que todas las muestras no solo tuvieran la misma cantidad de proteína sino que también tuvieran el mismo volumen. Los lisados se incubaron con 10 μ L de *Ras Assay Reagent*, el cual contiene *beads* de agarosa unidas a la proteína de fusión GST Raf-1 RBD (Raf-1 interacciona directamente con la proteína RAS-GTP (Takai *et al.*, 2001). El *dominio de unión de RAS* o RBD de esta proteína de fusión se une específicamente *in vitro*, con una afinidad 3 veces mayor a la forma activa RAS-GTP que a la forma inactiva de RAS-GDP (de Rooij and Bos, 1997)), en agitación durante 1 hora a 4°C. Las *beads* de agarosa se recogieron con un pulso de microcentrifuga (10 segundos a 14.000 rpm y a 4°C), se lavaron 3 veces con 200 μ L de solución de lisis (MLB) y se resuspendieron en *Laemmli sample buffer 2x*.

Las muestras del ensayo RAS-GTP (400 µg) y del análisis de Ras total (45 µg) se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida del 15 % (SDS-PAGE). A continuación, las muestras se resolvieron por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método de las secciones 6.1.3 y 6.1.4. Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5 % en agitación durante 1 hora y se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (Tabla 10).

Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios usados para el ensayo de *pull-down*.

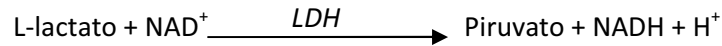
Anticuerpo	Peso molecular	Tipo	Casa Comercial	Origen	Solvente	Dilución de trabajo	Revelado
RAS clone 10	21 KDa	Primario	Millipore	Ratón	Leche	1:1000	ECL/ECL Plus
GST	45, 55 KDa	Primario	GE Healthcare	Cabra	Leche	1:1000	ECL
α – tubulina	55 KDa	Primario	Sigma Aldrich	Ratón	Leche	1:5000	ECL
Anti-mouse HRP	–	Secundario	Amersham, GE Healthcare	Oveja	Leche	1:1000 o 1:5000	–
Anti-goat IgG / HRP	–	Secundario	Dako	Conejo	Leche	1:5000	–

Posteriormente, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 10) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron usando *ECL Western blotting system reagent* para el análisis de RAS total, el GST y la tubulina, y *ECL Plus Western blotting system* para el ensayo RAS-GTP. Las imágenes se analizaron siguiendo el método de la sección 6.1.8.

Se usó el anticuerpo anti-GST como control de carga del ensayo *pull-down* debido a que su natura policlonal permite reconocer más de un epítipo de GST aumentado así su capacidad para reconocer proteínas de fusión GST (como la usada en este estudio Raf-1 RBD) aunque algunos de esos lugares de unión estén enmascarados por el plegamiento de la proteína recombinante. También se realizó el análisis de Ras total en los lisados celulares para verificar que los niveles de RAS de los que partimos para generar las muestras de *pull-down* no presentaban variaciones que pudieran inducir los cambios que se observaran en RAS-GTP.

6.4. Determinación de la Lactato deshidrogenasa (LDH).

La enzima lactato deshidrogenada (LDH) se encuentra ampliamente distribuida en los distintos tejidos de la economía. Esta enzima cataliza la conversión de L-lactato a piruvato y, en este proceso, NAD se reduce a NADH:



La actividad catalítica de LDH se determina midiendo el incremento de absorbancia mediante la espectrofotometría.

6.4.1. Tratamientos del cultivo y generación de las muestras.

Se sembraron 150.000 células en placas de 6 pocillos con medio completo. Las células se cultivaron durante 5 días tras los cuales se trataron con distintos fármacos en medio sin FBS. Tras el tratamiento se coleccionó 1 mL de sobrenadante del cultivo de cada muestra para determinar los niveles de LDH. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C.

6.4.2. Ensayo del lactato deshidrogenasa (LDH).

El ensayo LDH fue realizado en el *Servei de Bioquímica del Hospital de Bellvitge* siguiendo el método recomendado por la *Federació Internacional de Química Clínica (IFCC)* el cual consiste en un espectrometría molecular de absorción a 340 y 700 nm usando el analizador *Cobas c711* (Roche Diagnostics) con un calibrador *c.f.a.s* (Roche Diagnostics, ref. 759350). El reactivo usado para este estudio y para determinar estos niveles fue el LDH 1 GEN.2 (Roche Diagnostics, ref. 496456022). La trazabilidad de este método fue estandarizada por la IFCC.

Los analizadores calcularon automáticamente para cada muestra la concentración del analito en unidades de $\mu\text{kat/L}$, las cuales para obtener unas unidades de U/L es necesario multiplicarlo por el factor de conversión (0'0167). Estos analizadores tienen un intervalo de medida que se encuentra entre 10 – 1000 U/L (0'17-16'7 $\mu\text{kat/L}$).

7. ESTUDIO DEL PROTEOMA DE LAS MUESTRAS TUMORALES

El estudio del proteoma nos permite obtener una visión integrada de las proteínas en un proceso biológico concreto y una comparación de la expresión proteica en dos situaciones fisiológicas distintas. En nuestros experimentos se examinaron dos condiciones dadas por la administración o no de dasatinib.

Esta evaluación fue realizada en colaboración con la Dra. Ira Skvortsova en la *Innsbruck Medical University* (Innsbruck, Austria) con los tumores procedentes de la línea celular FaDu.

7.1. Homogeneización del tumor y extracción de las proteínas.

El tejido tumoral, que se encontraba criopreservado, se homogeneizó en 1 mL del tampón de homogeneización (HB) (250 mM de sacarosa, 3 mM de imidazol [Sigma–Aldrich Handels GmbH, Vienna, Austria] en agua bidestilada) con los inhibidores de proteasas (1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptina, 5 µg/mL aprotinina). Después de homogeneizarlo, la solución se centrifugó a 1.700 g y a 4°C durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se transfirieron a tubos *ependorfs*. Las proteínas se precipitaron usando el método de metanol/cloroformo descrito por Wessel y Flügge (Wessel and Flugge, 1984). El precipitado se resuspendió en tampón de lisis (7 M de urea, 2 M de tiourea, 40 mM de tris base, 1 % C7BZO [Sigma–Aldrich Handels GmbH, Vienna, Austria]). La concentración proteica se determinó con un ensayo proteico comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

7.2. Preparación y marcaje de las muestras.

Treinta µg de proteína en un volumen de 20 µL de tampón de lisis por tumor se incubaron con 180 pmol de *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (Amersham Bioscience, Vienna, Austria) durante 30 min. Con el fin de reducir las variaciones biológicas, a las muestras se les realizó un marcaje cruzado con Cy3 o Cy5 (primero el grupo XRT+C225 se marco con Cy3 y el grupo XRT+C225+DST con Cy5, y después se marcó el grupo XRT+C225 con Cy5 y el grupo XRT+C225+DST con Cy3). El Cy2 se usó como control interno de la técnica. Se resuspendieron en 280 µL de tampón de rehidratación (7 M de urea, 2 M de tiourea, 1 % C7BZO, 0'5 % tampón IPG, 60 mM de DTT) y se cargaron en tiras de 18 cm de gradiente no lineal (NL), de pH inmovilizado (rango 3 – 10).

7.3. Electroforesis bidimensional (2D DIGE).

Para la primera dimensión, se realizó una rehidratación activa a 50 V y a 20°C durante 12 h. El enfoque isoeléctrico se ajustó a 250 V durante 30 min., 500 V durante 1 h, 2.000 V durante 1 h y finalmente a 8.000 V hasta que se alcanzaron los 35.000 V/h usando el sistema *PROTEAN IEF Cell* (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria). Para la segunda dimensión, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida del 12'5 % con *PROTEAN II xi Cell System* siguiendo el método estándar recomendado por el fabricante (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria).

Después de la electroforesis, los geles fueron escaneados usando el *Typhoon™ 94100 Imager* a una resolución de 100 dpi (GE Healthcare, Vienna, Austria). El análisis estadístico de los *spots* con proteínas modificadas entre muestras se realizó usando el programa *DeCyder DIA* (Difference Ingel Analysis) y el programa *DeCyder Biological Variation Analysis* (BVA) (GE Healthcare, Vienna, Austria), fijando la *t-Student* del test en $< 0'05$.

7.4. Digestión enzimática e identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.

Los *spots* fueron extirpados con el *Ettan Spot Picker* (GE Healthcare, Vienna, Austria) y digeridos en el gel usando el kit *In-gel Tryptic Digestion* (Pierce, Rockford, IL, USA) que contiene una tripsina modificada. Esta digestión en gel fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos trípticos se agruparon, se desalinizaron usando una *microZipTipC18* (Millipore, Billerica, MA, USA) y se extrajeron en una diana MALDI con una solución matrix (6'2 mg/μL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico; Agilent Technologies, Amstelveen, Netherlands). El espectro de masas fue adquirido usando un instrumento *MALDI-TOF/TOF 4800* (Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d IJssel, Netherlands). La combinación de los espectros de MS y MS/MS, se buscaron con el *Explorer GPS* basado en el programa *MASCOT* (Applied Biosystems) contra las entradas de la especie humana de la base de datos *SwissProt* con un rango de tolerancia de peso de 20 ppm para MS y de -1 Da para MS/MS.

7.5. Identificación de la función, posibles vías de señalización e interacciones entre las proteínas.

Para estudiar las funciones de las proteínas identificadas y poder construir las posibles redes entre las proteínas, se uso el programa *PathwayStudio 8.0* (Adriane Genomics, Rockville MD, USA). *PathwayStudio 8.0* es un programa que ayuda a interpretar el sentido

biológico de la expresión proteica, para construir y analizar vías de señalización, y encontrar relaciones entre los genes, proteínas, procesos celulares y enfermedades. *PathwayStudio 8.0* está incluido en *ResNet*, una base de datos de interacciones moleculares y de vías, que contiene unas 715.000 relaciones para más de 100.000 proteínas y 2.175 procesos celulares, extraídos de los *abstracts* y artículos completos del *MEDLINE* (Abril 2011). Usando el *PathwayStudio 8.0*, todas las proteínas fueron analizadas para sus dianas más comunes.

8. ESTUDIOS SOBRE ÁCIDOS NUCLEICOS

Dado que el mecanismo de acción de cetuximab descansa en buena medida sobre la inhibición indirecta de la proteína RAS y que se ha descrito que DST puede promover la activación paradójica de BRAF y CRAF, induciendo una activación de RAS (Packer *et al.*, 2011), decidimos determinar si nuestras líneas celulares presentaban mutaciones en el gen *RAS*, al menos en el codón 12 y 13 de KRAS, los codones más frecuentemente alterados.

8.1. Extracción del ADN a partir de *pellets* celulares.

Se realizó una extracción de ADN a partir de *pellets* de células A431 o FaDu. Se lavó dos veces con PBS el *pellet* procedente de la disgregación de una monocapa celular confluyente (discos de 56 cm²), se transfirió el volumen a tubos *ependorf* y se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm y a temperatura ambiente. Se homogeneizaron los nuevos *pellets* con el vórtex en 250 µL de la solución 10-10-0'15 TEN (10 mM Tris pH 7'5, 10 mM EDTA, 0'15 M NaCl) y se trataron con 6 µL de proteinasa K (concentración 20 mg/mL), y con 15 µL de SDS 10 %. Se incubaron durante 3 h a 65°C y en agitación. A continuación, se inactivó la proteinasa K incubando las muestras durante 15 min a 75°C y el ARN con 2 µL de RNasa durante 1 h a 37°C. Se añadió 300 µL de la solución 10-10-0'65 TEN (10 mM Tris pH 7'5, 10 mM EDTA, 0'65 M NaCl) y 300 µL de Fenol/Sevag. Se agitó por inversión y se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió un 10 % de acetato sódico 3 M (pH 5'2) y 2 volúmenes de etanol absoluto con los cuales se incubó toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el ADN con 1 mL de etanol de 70°C, se volvió a centrifugar durante 10 min a 12.000 rpm y se eliminó el sobrenadante (este proceso se repitió una vez más). Eliminados los restos de etanol, se resuspendió en 50 µL de agua estéril (Braun). Se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

8.2. Cuantificación del ADN.

Una vez extraído, el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop* y su pureza se determinó mediante el cociente de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. En una aproximación a la pureza, se considera que la relación A_{260}/A_{280} debe ser superior a 2. Para realizar este tipo de análisis necesitamos que la concentración del ADN se sitúe entre los 50 – 100 µg/µL.

8.3. Amplificación del ADN mediante PCR.

Para el análisis mutacional del exón 2 del gen *KRAS*, se amplificó dicho exón mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando cebadores y bajo unas condiciones de amplificación específicas (ver más adelante). Se usó 1'5 µl de ADN genómico procedente del *pellet* de las células a estudiar a una concentración de 50 – 100 µg/µL. La reacción se realizó usando la polimerasa *Thermus aquaticus* (Taq) de *Invitrogen* (Paisley, UK), Mg₂Cl, dNTPs y tampón 1x según las especificaciones del fabricante, y los cebadores mencionados en la Tabla 11. La reacción se llevó a cabo en un termociclador 2720 *ThermalCycler Applied Biosystems*, siguiendo el programa: 3 min de desnaturalización a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos a 92°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C, y finalmente un paso de elongación de 10 min a 72°C.

Tabla 11. Secuencias de los cebadores usados para la detección del exón 2 de KRAS.

Cebadores	Secuencia (5'→3')
<i>Up</i>	GGTGGAGTATTTGATAGTGTA
<i>Down</i>	ATGGTCCTGCACCGTAATATGCA

La calidad del producto amplificado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1'5 % en Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8'3) y se visualizó mediante tinción con *SyBr Safe DNA gel stain* (Invitrogen).

8.4. Purificación del ADN y reacción de secuenciación.

Para eliminar el exceso de cebadores y de reactivo de la PCR, el ADN amplificado se purificó mediante el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual se basa en un método de purificación por columnas.

Para la secuenciación, se partió de 1 µL del producto de la PCR de amplificación una vez purificado y se añadió 1 µL de la mix de secuenciación 3.1 de la casa comercial *Applied Biosystems* (contiene los dNTPs y ddNTPs marcados con fluorocromos distintos), 1'5 µL del tampón de secuenciación 5x y 1'5 µL del cebador a una concentración de 3'2 µM. Se añadió el volumen restante hasta 10 µL de agua bidestilada. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 55°C y 4 min a 60°C. Estas reacciones se analizaron con un secuenciador automático por electroforesis capilar ABI3730 de *Applied Biosystems* y las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa *Mutation Surveyor V3.10 (Network)*.

Resultados

1. MODELO EXPERIMENTAL: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR RESISTENTE A CETUXIMAB

La combinación de la radioterapia con cetuximab mejora el control y la supervivencia en cáncer de cabeza y cuello. Esto, ha convertido esta combinación en una terapia estándar usada en clínica (Bonner *et al.*, 2006). Aun así, menos del 20 % de los pacientes tratados con cetuximab responden satisfactoriamente al tratamiento debido a la existencia de mecanismos de resistencia intrínseca o adquirida. La existencia de vías de transducción de señales que emplean rutas alternativas explicaría en parte la resistencia al bloqueo del receptor de EGF (Camp *et al.*, 2005; Raben *et al.*, 2005). Un ejemplo, recientemente descrito, sería la interacción entre EGFR y SRC, cuyo sinergismo está implicado en distintos tipos de cánceres agresivos (Biscardi *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 1999).

Uno de los objetivos específicos de este estudio fue el desarrollo y la caracterización de un modelo resistente a cetuximab para profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia y las estrategias para revertirla.

1.1. Generación de una línea celular resistente a cetuximab *in vitro* e *in vivo*.

1.1.1. Las líneas A431 y FaDu adquieren una resistencia estable a concentraciones crecientes de C225.

En primer lugar, se expusieron los cultivos a distintas dosis de C225 (0, 30, 60, 120, 240, 480 y 1.280 nM) y se testó, mediante ensayo clonogénico, la viabilidad celular de las líneas parentales (WT). En ambas líneas, el C225 disminuyó la formación de colonias, sobre todo en las células FaDu donde tuvo un mayor efecto. Una dosis de 30 nM, dosis tomada como referencia de la literatura, disminuyó a un 60 % la capacidad clonogénica de las células A431-WT y a un 25 % la de las células FaDu-WT. Dosis superiores no incrementaron significativamente la toxicidad del anticuerpo (Tabla 12).

Con el objetivo de generar células A431 y FaDu resistentes a C225 (R), ambos tipos celulares se sometieron a concentraciones crecientes del anticuerpo en sucesivas rondas de cultivo (procedimiento descrito en el punto 3.1 de material y métodos, pagina 57). Para evaluar la adquisición de la resistencia a C225, las líneas A431-R y FaDu-R se trataron con C225 y se comparó su capacidad de formación de colonias con la de las líneas parentales. En ambas

líneas, las células R presentaron una formación de colonias superior a las células WT. En la línea celular A431, a una dosis de 30 nM la supervivencia de las células R respecto a las WT fue de un 90'6 % vs un 58'3 % ($p = 0'004$), respectivamente (Figura 16A). Estos valores se mantuvieron muy similares a lo largo de las distintas dosis de C225. En la línea celular FaDu, a una dosis de 30 nM la supervivencia de las R respecto a las WT fue de un 78'6 % vs un 28'5 % ($p = 0'004$), respectivamente (Figura 16B). Como en la línea A431, estos valores también se mantuvieron sin variaciones a lo largo de las distintas dosis de C225. Estos resultados indican que las A431-R y las FaDu-R habían adquirido un fenotipo resistente al C225.

Tabla 12. Porcentaje de formación de colonias después del tratamiento con C225.

WT					
Células A431			Células FaDu		
Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Valor de p	Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Valor de p
0	100'0 \pm 0'0		0	100'0 \pm 0'0	
30	58'3 \pm 2'4	0'000	30	24'2 \pm 5'0	0'000
60	63'4 \pm 3'4	0'000	60	24'3 \pm 3'6	0'000
120	56'4 \pm 4'0	0'001	120	21'4 \pm 8'0	0'001
240	56'2 \pm 5'0	0'001	240	22'8 \pm 7'5	0'001
480	61'1 \pm 3'9	0'001	480	26'2 \pm 4'9	0'002
1280	53'3 \pm 3'7	0'000	1280	33'9 \pm 8'1	0'002
R					
Células A431			Células FaDu		
Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Valor de p	Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Valor de p
0	100'0 \pm 0'0		0	100'0 \pm 0'0	
30	90'6 \pm 2'2	0'000	30	78'6 \pm 8'8	0'005
60	90'4 \pm 2'2	0'000	60	84'2 \pm 6'9	0'005
120	93'5 \pm 1'6	0'001	120	68'0 \pm 20'5	0'016
240	92'7 \pm 1'5	0'001	240	76'2 \pm 18'2	0'016
480	91'1 \pm 2'5	0'001	480	93'7 \pm 5'0	0'010
1280	90'9 \pm 1'8	0'000	1280	91'6 \pm 9'5	ns

Valor de p: comparado con el control (0 nM); ns: no significativo. (n = 9 para A431 WT y R, n = 8 para FaDu-WT, n = 5 para FaDu-R).

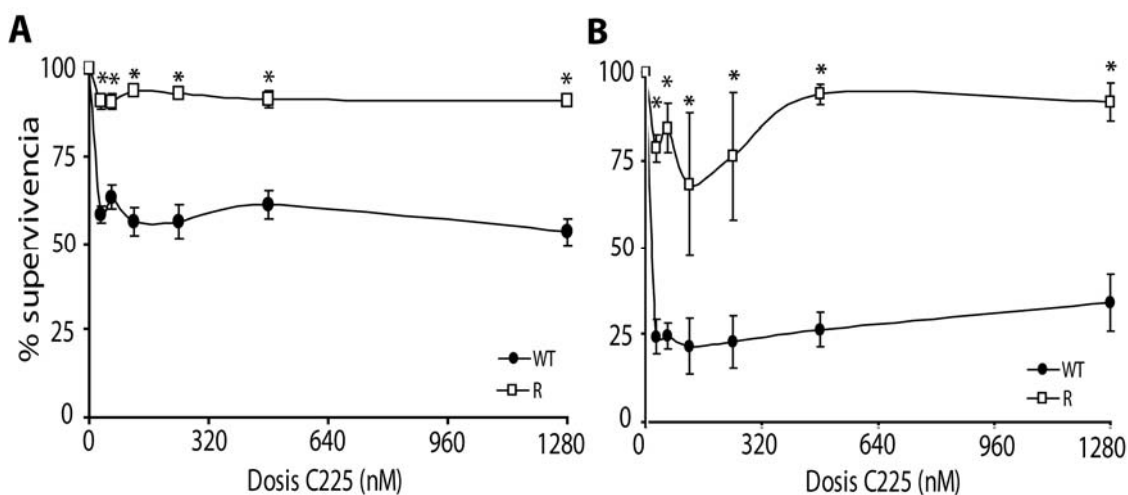


Figura 16. Evaluación de la resistencia al C225 de las líneas celulares A431 (A) y FaDu (B) *in vitro*. Se sembraron 1.000 células por triplicado en discos de 21 cm². Se trataron con C225 durante 14 días tras los cuales se tiñeron con cristal violeta para el recuento de colonias. * $p \leq 0,05$ comparado con la línea WT (*Mann-Whitney test*).

Para determinar si la resistencia a C225 era estable, se cultivaron las células resistentes sin C225 durante 5 semanas. A continuación, éstas se sometieron a una dosis de C225 de 1.280 nM. La formación de colonias se mantuvo elevada independientemente de la dosis de C225, confirmándose la estabilidad del fenotipo resistente (Figura 17).

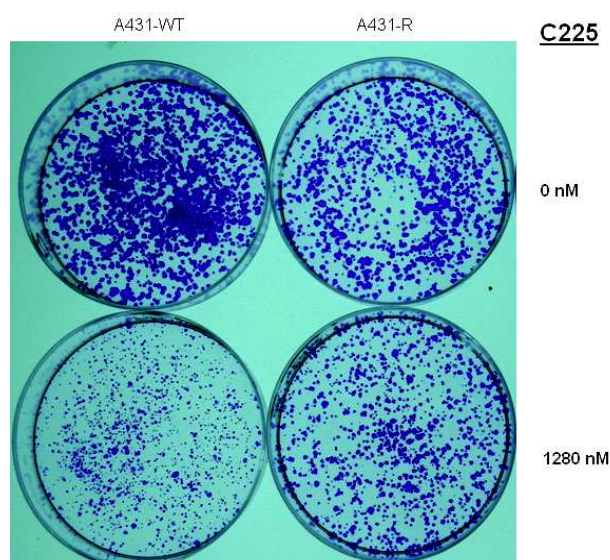


Figura 17. Evaluación de la estabilidad del fenotipo resistente *in vitro* en células A431. Ensayo clonogénico realizado a partir de cultivos celulares. Se sembraron 1.000 células A431-WT o A431-R. Tras la siembra, las células se trataron con 1.280 nM de C225.

1.1.2. Las líneas A431-R y FaDu-R conservan *in vivo* la resistencia al C225 adquirida *in vitro*.

Para comprobar si las células A431-R seguían siendo resistentes *in vivo* se implantaron fragmentos tumorales procedentes de tumores A431 derivados de células parentales o de células resistentes en el tejido subcutáneo de ratones atímicos. Los ratones se trataron a continuación con 1 mg de C225 dos veces por semana hasta el momento de su sacrificio. A día +8 se inhibió el crecimiento de los tumores A431-WT. Por el contrario, los tumores derivados de A431-R experimentaron un crecimiento tumoral progresivo, alcanzando a +71 un tamaño tumoral de $1.351 \pm 432 \text{ mm}^3$, claramente mayor que el tamaño alcanzado por los tumores derivados de las células parentales ($89 \pm 8 \text{ mm}^3$) (Figura 18A). Los tumores A431-WT y A431-R de los ratones control (suero fisiológico) no presentaron diferencias de crecimiento (datos no mostrados).

En cuanto a las células FaDu WT y R, éstas se inyectaron directamente en el tejido subcutáneo de los ratones atímicos. El crecimiento de los tumores FaDu-R fue mayor que el de los tumores WT. A día +29, fue de $776 \pm 163 \text{ mm}^3$ y $496 \pm 39 \text{ mm}^3$, respectivamente (Figura 18B). En los ratones control no se observaron estas diferencias (datos no mostrados).

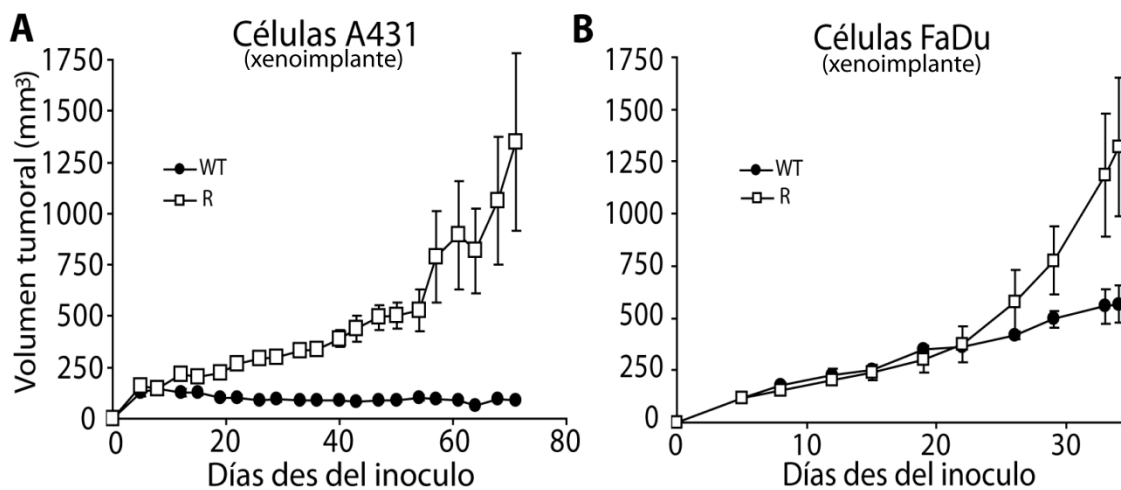


Figura 18. Evaluación de la resistencia *in vivo*. (A) Se trasplantaron fragmentos tumorales procedentes de tumores derivados de células A431-WT o A431-R en el tejido subcutáneo de ratones atímicos. (B) Se inocularon 10^6 células FaDu-WT o FaDu-R en el tejido subcutáneo de ratones atímicos. En A y B, los ratones se trataron según la Figura 78. Los símbolos indican el promedio de n tumores y las barras indican el error estándar (A431, $n = 4$ tumores por tipo celular; FaDu, $n = 3$ tumores por tipo celular).

2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS

La descripción en diversos estudios de la existencia de un mecanismo de cooperación entre EGFR y SRC en líneas celulares de mama y de fibroblastos murinos (Biscardi *et al.*, 1999; Boerner *et al.*, 2005; Tice *et al.*, 1999) y que la coexpresión de EGFR y SRC se da en distintos tipos de cáncer, nos llevó a evaluar si la inhibición concomitante de EGFR, con C225, y SRC, con DST, podía potenciar la eficacia antitumoral de la radioterapia en tumores dependientes de EGFR.

2.1. Resultados obtenidos *in vitro*.

Previo a la evaluación de los tratamientos en un modelo animal, se examinaron los efectos citotóxicos de C225 y DST, individualmente o en combinación, en cultivos celulares.

***** MEDIANTE ENSAYO CLONOGÉNICO *****

2.1.1. Sensibilidad de las líneas celulares al C225.

2.1.1.1. Las líneas A431-WT y FaDu-WT son sensibles al C225.

Tal y como se mostró en la sección 1 de resultados, en ambas líneas, el C225 fue activo y disminuyó la formación de colonias (Tabla 12).

2.1.2. Sensibilidad de las líneas celulares al DST.

2.1.2.1. Las líneas A431-WT, A431-R, FaDu-WT y FaDu-R son sensibles al DST.

En cuanto al efecto del DST se observó que una dosis de 10, 20, 50 o 150 nM inhibía la formación de colonias en un grado variable según el tipo de líneas.

Tabla 13. Porcentaje de formación de colonias después del tratamiento con DST.

Células A431			
WT		R	
Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Dosis (nM)	Promedio \pm SE
0	100'0 \pm 0'0	0	100'0 \pm 0'0
10	100'5 \pm 0'0	10	97'9 \pm 1'0
20	100'1 \pm 0'7	20	98'2 \pm 0'8
50	86'6 \pm 1'7	50	77'9 \pm 10'0
150	29'4 \pm 4'8	150	14'3 \pm 5'4
Células FaDu			
WT		R	
Dosis (nM)	Promedio \pm SE	Dosis (nM)	Promedio \pm SE
0	100'0 \pm 0'0	0	100'0 \pm 0'0
10	93'0 \pm 6'5	10	67'7 \pm 23'6
20	76'9 \pm 1'4	20	31'7 \pm 10'0

50	21'5 ± 0'0	50	9'8 ± 2'9
150	2'3 ± 1'1	150	1'6 ± 0'2

Se sembraron 1.000 células por triplicado en discos de 21 cm². Se trataron con dosis crecientes de DST. Transcurridos 14 días, las colonias se tiñeron con cristal violeta (n = 2 para cada línea celular).

El DST disminuyó la formación de colonias, sobre todo en las células FaDu. Una dosis de 50 nM disminuyó a un 87 % la capacidad clonogénica de las células A431-WT, a un 78 % en las células A431-R, a un 22 % en las células FaDu-WT y a un 10 % en las células FaDu-R. Aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas, el efecto citotóxico del DST parece mayor en la línea celular FaDu. Asimismo, se observó un efecto mayor en las líneas resistentes al C225, lo que podría estar indicando que las células que adquirieron resistencia al C225 dependerían en mayor medida de dianas inhibidas por DST. En conjunto, el efecto citotóxico del DST fue menor que el del C225 (Tabla 13).

2.1.3. El tratamiento con DST sensibilizó a las células al C225.

2.1.3.1. El tratamiento concomitante de C225 y DST disminuyó la formación de colonias.

*** En células parentales.

Para determinar si el efecto antitumoral producido por el C225 en las líneas celulares parentales podía ser potenciado por DST, se trataron células A431-WT y FaDu-WT con dosis crecientes de C225 (0, 30, 60, 120 y 240 nM) en ausencia o presencia de una dosis fija de DST, 20 nM en el caso de las células A431-WT y 2 nM en el caso de las FaDu-WT.

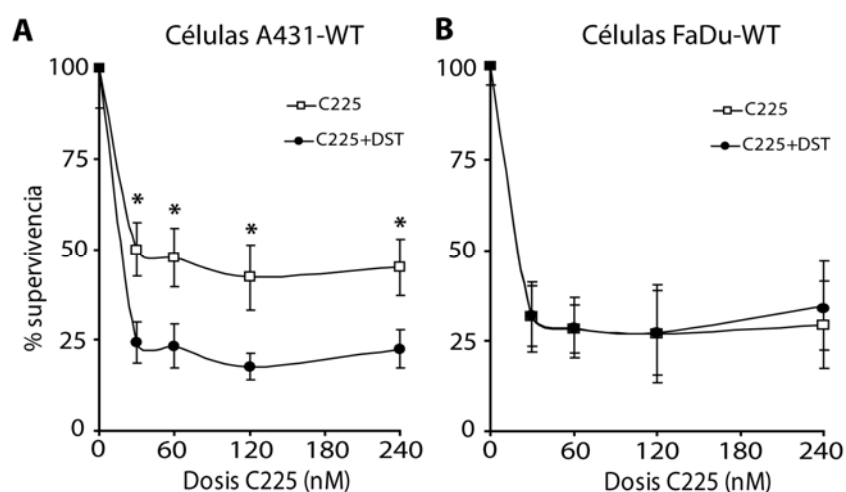


Figura 19. Efecto del tratamiento concomitante de DST y C225 en células A431-WT y FaDu-WT. Se sembraron 2.000 células por triplicado en discos de 21 cm². Se trataron con dosis crecientes de C225 en ausencia o presencia de DST. Transcurridos 14 días, las colonias se tiñeron con cristal violeta. Los valores promedio están normalizados por el efecto del DST solo. n = 5 para A431-WT, n = 3 para FaDu-WT. * $p < 0'05$ comparado con C225 solo (*Mann-Whitney test*).

Cuando el DST se combinó con C225 se observó una disminución en la formación de colonias en la línea A431-WT (Figura 19A). La adición del DST a una dosis de 30 nM de C225 incrementó la eficacia del C225 en un factor de 2'06 (de un $50'0 \pm 7'5$ % a un $24'3 \pm 5'6$ %, $p=0'028$). En cambio, el DST no modificó el efecto del C225 sobre la línea FaDu (Figura 19B).

Como las FaDu-WT no presentaron una reducción de la formación de colonias con la adición de DST a una dosis de 2 nM, se decidió administrar 20 nM. Así se constató que una dosis de 20 nM de DST condujo a una disminución en la formación de colonias superior a la que producía el C225 por si solo (Figura 20).

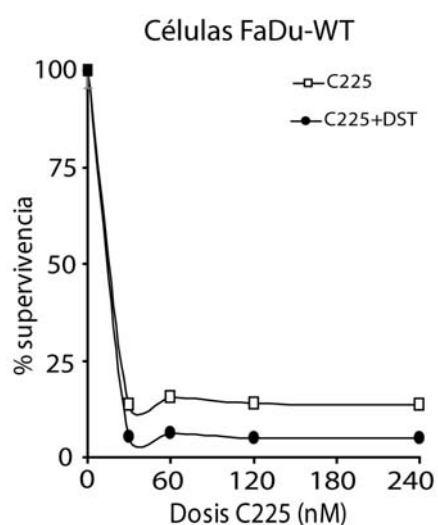


Figura 20. Efecto DST 20 nM en combinación con C225 en FaDu-WT *in vitro*. Los datos de la figura se obtuvieron siguiendo la metodología expuesta en la figura 19.

*** En células resistentes.

Las mismas dosis de C225 y DST que se administraron a células parentales se aplicaron a las células resistentes. Se observó una disminución en la formación de colonias en ambas líneas superior a la que se detectó en las células parentales, sobretudo en la línea A431-R (Figura 21).

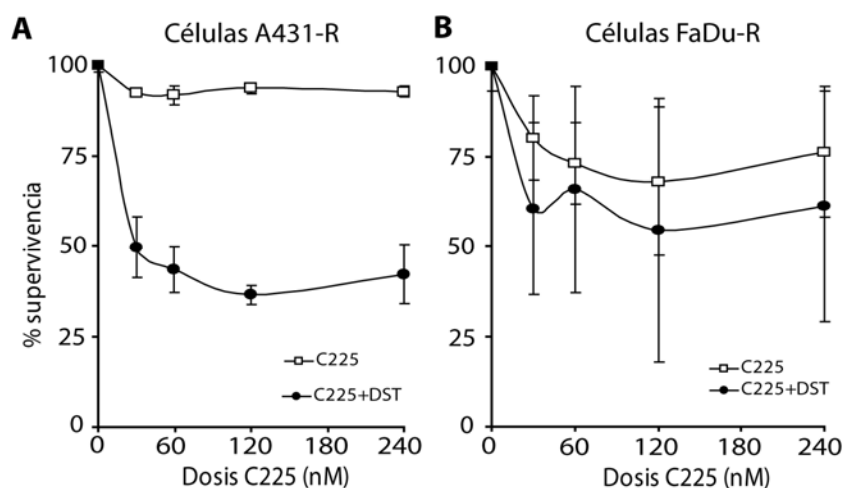


Figura 21. Efecto del tratamiento concomitante con DST y C225 en A431 y FaDu R. Los datos de la figura se obtuvieron siguiendo la metodología expuesta en la figura 19.

Cuando se añadió DST a C225 en las células resistentes se observó una sensibilización al C225 (datos normalizados por el efecto del DST solo) (Figura 21).

A continuación, se decidió evaluar por otras metodologías si existía o no un sinergismo entre C225 y DST.

******* MEDIANTE ENSAYOS DE CITÓSTASIS (MTT) *******

2.1.4. DST inhibió la viabilidad celular en ambas líneas, pero cuando se combinó con C225 no se observó un efecto aditivo significativo.

Para profundizar en el estudio del efecto citotóxico del DST se trataron las células A431-WT y FaDu-WT con EGF, C225 o AG1478 en ausencia o presencia de DST y se evaluaron mediante la técnica MTT (ver detalles en anexo 1 pagina 173).

La administración de C225, AG1478 o del ligando EGF inhibió la viabilidad celular (MTT) en ambas líneas celulares (Figura 22 A y B). Cuando se combinó el ligando con los fármacos anti-EGFR, se observó una mayor inhibición de la viabilidad celular con C225 pero no se observaron cambios cuando se combinó con AG1478.

En las células A431 (Figura 22A), la administración de DST inhibió la viabilidad celular respecto al control, niveles (% de inhibición) que se mantuvieron sin cambios a pesar de la combinación con C225 o AG1478.

En las células FaDu (Figura 22B), la administración de DST también inhibió la viabilidad celular respecto al control que se mantuvo invariable cuando se combinó con fármacos anti-EGFR.

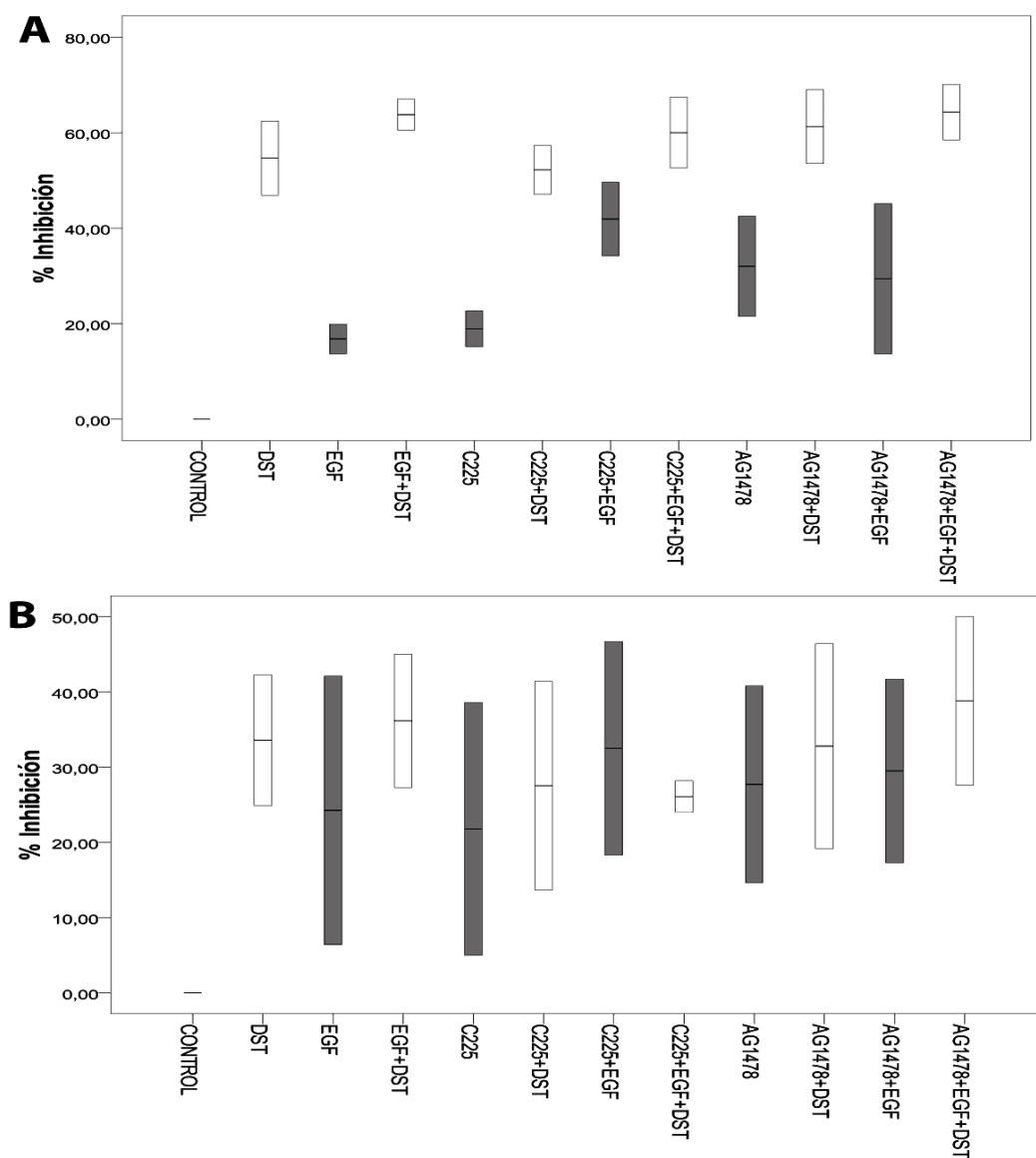


Figura 22. Efecto de los tratamientos sobre la metabolización de MTT. Se sembraron 800 células A431-WT (A) o FaDu-WT (B) por duplicado en placas de 6 pocillos. Se trataron con EGF (10 ng/mL x 10 min.), C225 (30 nM x 48 h), AG1478 (100 nM x 2 h) en ausencia (columnas en gris) o presencia (columnas en blanco) de DST (150 nM x 48 h). Se aplicó fórmula de *Singh* (*Singh et al.*, 1995). Se realizaron dos experimentos independientes por línea celular.

***** MEDIANTE LA MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN *****

2.1.5. DST indujo la proliferación cuando se combinó con C225.

Se determinó el efecto de DST sobre la proliferación celular en cultivos semiconfluentes. Para ello, se trataron A431-WT y FaDu-WT con 30 nM de C225 en ausencia o presencia de DST (150 nM).

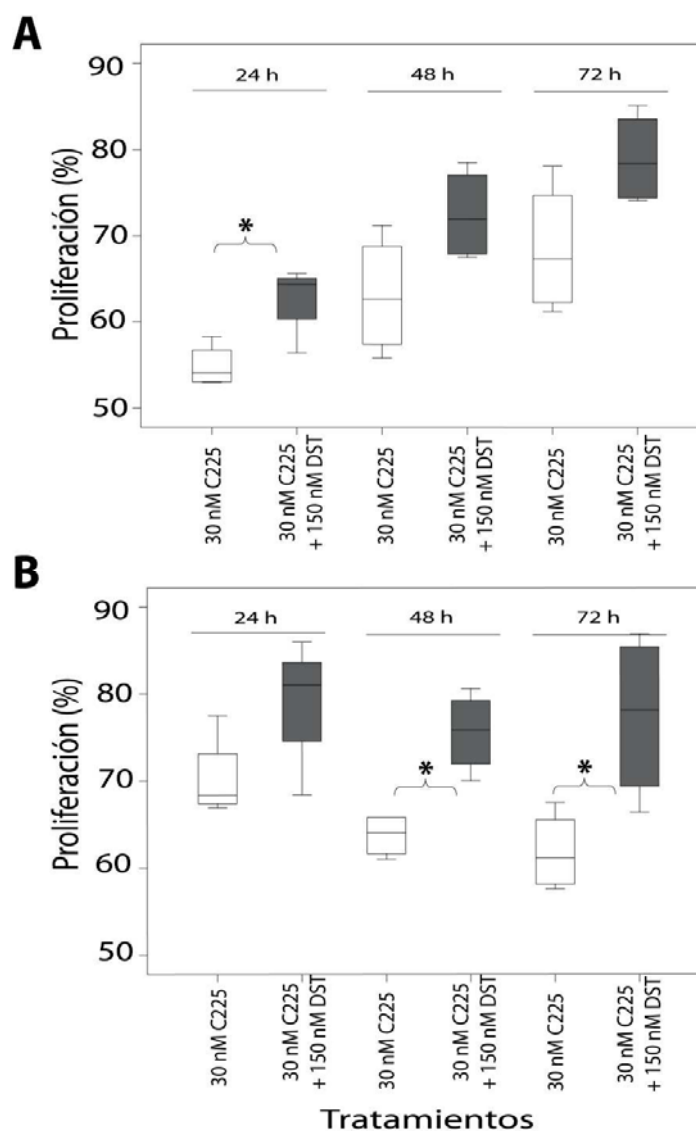


Figura 23. Efecto del DST *in vitro* en la proliferación. Se sembraron 250.000 células A431-WT (A) o FaDu-WT (B) por duplicado en discos de 21 cm². Las células se trataron con C225 en ausencia (blanco) o presencia (gris) de DST por 0, 24, 48 y 72 h. El número de células se normalizó por el número de células del tiempo de incubación 0 h. Se realizaron dos experimentos independientes por línea celular. * $p < 0'05$ comparado con C225 solo (*Mann-Whitney test*).

En la línea celular A431-WT, el tratamiento inicial con C225 inhibió la proliferación celular en un $55'0 \pm 1'2$ % (resultado a las 24 h de tratamiento). Sin embargo, el número de células ya no disminuyó sino que se incrementó hasta un $63'1 \pm 3'5$ % y un $68'5 \pm 3'9$ % a 48 y 72 h, respectivamente. En lugar de sensibilizar las células a C225, DST indujo la proliferación celular. A 24 h, el número de células alcanzó un $62'7 \pm 2'1$ % ($p = 0'043$, comparado con C225 solo); a 48 h, un $72'5 \pm 2'7$ % ($p = 0'083$); y a 72 h, un $79'0 \pm 2'7$ % ($p = 0'083$) (Figura 23A).

En la línea celular FaDu-WT, la adición de DST provocó un incremento de la proliferación celular de un $70'3 \pm 2'4$ % a un $79'1 \pm 3'8$ % ($p = 0'083$); de un $63'7 \pm 1'2$ % a un

75'6 ± 2'3 % ($p = 0'029$), y de un 61'8 ± 2'3 % a un 77'4 ± 4'8 % ($p = 0'043$), a 24, 48 y 72 h, respectivamente (Figura 23B).



En conjunto, estos datos muestran que la monoterapia con C225 y DST puede eliminar células A431 y FaDu. Sin embargo, la combinación de C225 y DST produce resultados controvertidos. Por una parte, parece que existe un efecto sinérgico en cuanto a la supervivencia celular clonogénica, pero por otra parte, surge la duda de si DST puede activar algún tipo de mecanismo reactivo que antagoniza con el C225, al menos en lo que se refiere a la proliferación celular en cultivos semiconfluentes. En cualquier caso, los resultados *in vitro* ensombrecieron y cuestionaron la viabilidad de la hipótesis inicial —si DST podría potenciar el efecto antitumoral o revertir la resistencia a C225—.



2.2. Resultados obtenidos *in vivo*.

Dadas las diferencias observadas en los resultados procedentes de los experimentos en cultivos celulares, donde la interacción de célula a célula y los cortos periodos de tratamiento aplicados podrían estar afectando la supervivencia celular, decidimos trasladar estos estudios a un modelo más cercano a la tumorigénesis real, como es la implantación de tumores en ratones atímicos.

2.2.1 El tratamiento concomitante de C225 y DST empeora el control tumoral.

Se trataron tumores procedentes de células A431 y FaDu WT con C225 o C225 y DST.

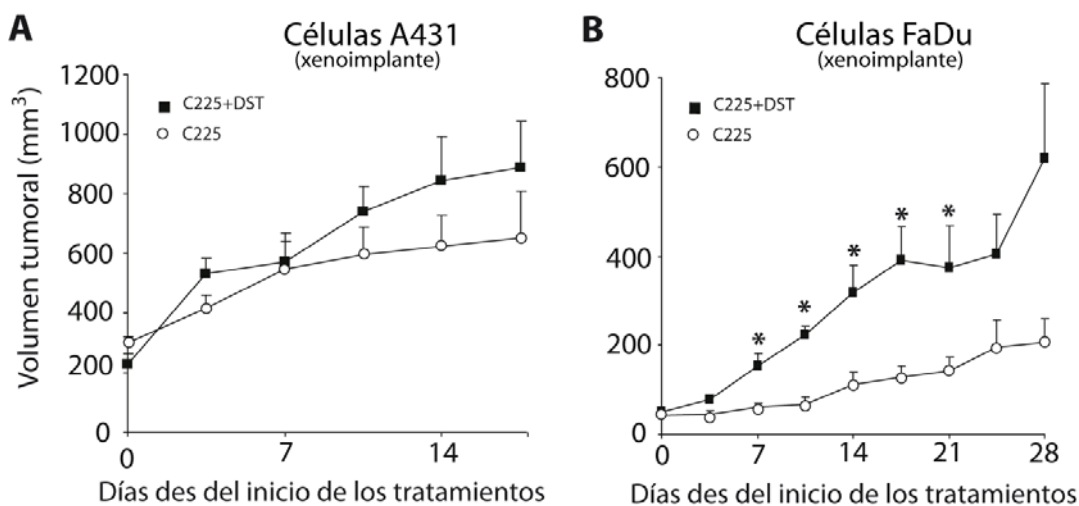


Figura 24. Efecto del tratamiento concomitante de C225 y DST *in vivo*. Se inocularon 10^6 células A431-WT (A) o FaDu-WT (B) en el tejido subcutáneo de la región escapular de ratones atímicos. Se trataron según Figura 77. Los tratamientos tuvieron una duración de 2 semanas. Los valores provienen del promedio de ≥ 5 tumores independientes \pm SE por grupo. * $p < 0.05$ comparado con los valores de C225 solo (*Mann-Whitney test*).

El crecimiento de los tumores A431 fue más agresivo en los ratones tratados con DST (Figura 24A). Observación aún más clara en los tumores FaDu (Figura 24B). A día +17, el tamaño de los tumores A431 tratados con ambos agentes, comparado con los tratados solo con C225, había aumentado de 650 mm^3 a 889 mm^3 . Para los tumores FaDu, estos valores se situaron en 128 mm^3 y 390 mm^3 ($p = 0.029$), respectivamente.



A partir de esta observación, que confirmó lo contrario de la hipótesis de partida, dirigimos las investigaciones hacia el esclarecimiento de un posible efecto antagónico asociado al DST. Una de las consecuencias fue que a pesar de haber generado dos sublíneas celulares con una tolerancia estable a C225 se prefirió seguir la investigación con células parentales. Por otra parte, y dado que la intención de nuestro trabajo fue su aplicabilidad clínica y que el C225 se combina con radioterapia en tumores de cabeza y cuello, decidimos evaluar si la combinación con radioterapia producía o no un efecto antagónico.



En primer lugar, fue necesario establecer el modelo experimental que permitiera irradiar tumores implantados en ratones. Los resultados acerca de la metodología empleada se exponen a continuación.

2.2.2. Técnica para irradiar xenoinjertos en ratones atímicos usando una unidad de radioterapia.

La Figura 25 describe la irradiación selectiva de los tumores en un acelerador lineal. Se verificó la dosis prescrita mediante una dosimetría *in vivo* con películas radiocrómicas (Gafchromic EBT). En total, se llevaron a cabo 40 mediciones en 10 ratones durante 4 días distintos. Encontramos una variación inferior al 3 % en la dosis recibida entre los distintos ratones en la misma sesión y una variación menor de 1.5 % entre los distintos días. El promedio de la desviación de la dosis absorbida en los tumores fue de un 2.3 % respecto a la dosis calculada.

Dos días antes de la irradiación, cuando los tumores habían alcanzado entre 100 y 200 mm³, los ratones se estabularon en una sala de cuarentena. Antes de cada sesión de radioterapia, los ratones fueron anestesiados (punto 4.2 de material y métodos) y transportados a la unidad de radioterapia en jaulas autoclavadas. A la llegada a la unidad de radioterapia, la mesa de tratamiento se desinfectó con alcohol y se cubrió con tallas estériles. Se usaron gorros quirúrgicos, mascarillas y guantes estériles durante la manipulación de los animales en el interior del búnker del acelerador.

En la Tabla 14 se describe la salud de los animales durante el tratamiento y el seguimiento. Se registró la observación más severa, fuera o no reversible. Los animales se evaluaron dos veces por semana en función de diversos parámetros de supervisión.

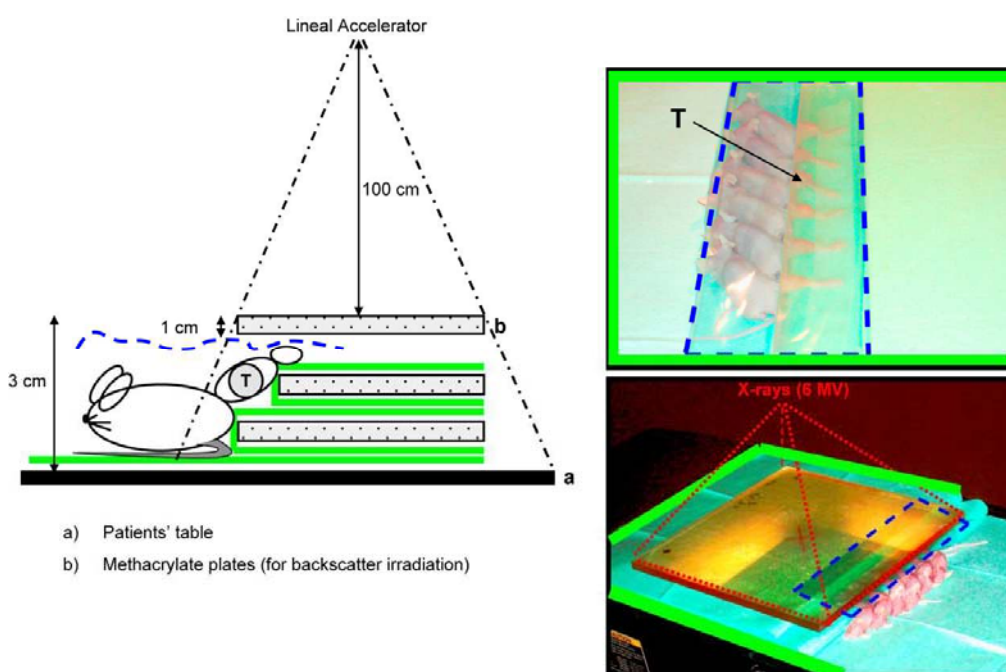


Figura 25. Esquema usado para la irradiación localizada de xenoinjertos en múltiples fracciones. Los tumores (T) se situaron entre el espacio creado por dos placas de metacrilato (b), cada una de tamaño 35 cm x 35 cm x 1 cm, separadas por una placa más pequeña (30 x 30 x 1). El haz de rayos X se ajustó para cubrir el tumor con un margen de 1 cm, asegurando que el metacrilato se incluía en el haz. Las patas derechas (dónde está el tumor) se fijaron con cinta adhesiva, mientras que el cuerpo de los animales (anestesiados) se mantenía fuera del haz. Las tallas estériles que cubren la mesa de tratamiento (a) y que envuelven las placas están representadas con líneas verdes. Las líneas azules punteadas ilustran las películas transparentes estériles que colocamos encima de los ratones para protegerlos del metacrilato no estéril superior, de la misma forma como muestra la fotografía. La distancia entre la placa y la fuente se situó a 100 cm del centro de la placa superior. Las dimensiones en el diagrama no están a escala.

Tabla 14. Calidad de vida de los ratones durante y después de la irradiación localizada de múltiples fracciones.

Parámetros de supervisión	RATONES CONTROL (SIN IRRADIAR)								RATONES TRATADOS CON RADIACION							
	Periodo de tratamiento (n=13)				Periodo post-tratamiento (n=12)				Periodo de tratamiento (n=32)				Periodo post-tratamiento (n=31)			
	Grado (%)				Grado (%)				Grado (%)				Grado (%)			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
<i>Pérdida de peso</i> ¹	76'9	15'4	7'7	0	83'3	8'3	8'3	0	43'8	46'9	9'4	0	61'3	35'5	3'2	0
<i>Aspectos físicos</i> ²	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
<i>Señales clínicas</i> ³	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
<i>Alteraciones del comportamiento</i> ⁴	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	87'1	12'9	0	0
<i>Infecciones</i> ⁵	100	0	0	-	100	0	0	-	100	0	0	-	100	0	0	-
<i>Deposiciones</i> ⁶	100	0	0	-	100	0	0	-	100	0	0	-	100	0	0	-
<i>Necrosis tumoral</i> ⁷	100	0	-	-	91'7	8'3	-	-	100	0	-	-	100	0	-	-
<i>Toxicidad tumoral</i> ⁸	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0

Los valores son la proporción de observaciones expresadas en grados relacionadas con el número total de animales (n). (1) Pérdida de peso. Grados: 0 No hay pérdida de peso; 1 pérdida menor de un 10 %; 2 entre un 10 y un 20 %, y 3 pérdida mayor de un 20 %. (2) Aspecto físico. Grados: 0 normal; 1 cambios en el color de la piel; 2 palidez y cianosis, y 3 encorvamiento y pérdida de masa muscular. (3) Señales clínicas. Grados: 0 no hay presencia; 1 hipotermia; 2 sangrado o secreción de las mucosas de cualquier orificio, y 3 presión abdominal y caquexia. (4) Alteraciones del comportamiento. Grados: 0 sin alteraciones; 1 incapacidad para moverse normalmente; 2 imposibilidad para llegar a la comida/bebida, y 3 inconsciencia o falta de respuesta a estímulos externos. (5) Porcentaje de animales con enfermedades infecciosas. Grados: 0 no hay infecciones; 1 animales infectados que sobreviven, y 2 animales infectados que mueren. Grado 3 no se evalúo (NA). (6) Aspecto de las deposiciones. Grados: 0 normal; 1 deposiciones blandas, y 2 sangre visible. Grado 3 NA. (7) Porcentaje de necrosis por tumor. Grados: 0 no hay necrosis tumoral, y 1 necrosis tumoral. Grado 2 y 3 NA. (8) Toxicidad inducida por la radiación local. Grados: 0 no hay presencia; 1 eritema; 2 lesión exudativa, y 3 necrosis.

El efecto adverso más destacado fue la disminución del peso. No obstante la pérdida de peso se limitó a un grado 1 (menor de un 10 %), fue transitoria y no estaba asociada a ningún signo físico o clínico de enfermedad. Se observó que los ratones no irradiados tenían una pérdida de peso aun mayor que los ratones irradiados, la cual se encontraba asociada con el crecimiento tumoral descontrolado. Las diferencias que encontramos de pérdida de peso entre ambos grupos no fueron significativas (Test *Chi-square* y *Mann-Whitney U*).

En el grupo de ratones irradiados, dos animales (12'9 %) se movían de forma anormal. Este hecho se atribuyo a un crecimiento tumoral ya que no presentaban ningún signo que indicara que se tratara de una reacción local a la radiación administrada. No se observó ninguna infección en los animales, independientemente del tratamiento que recibieran y a pesar de existir un mayor riesgo microbiológico debido a la manipulación en áreas no libres de

patógenos. Por último, todos los animales fueron sacrificados cuando se cumplió el criterio de punto final determinado por el tamaño tumoral. No fue necesario sacrificar ningún animal por criterios de salud animal (grados 2 o 3).

2.2.3. Efecto antitumoral de los tratamientos en tumores derivados de A431-WT.

Con la técnica mencionada arriba se administró la radioterapia en 10 días consecutivos tratando de imitar los tratamientos clínicos que se aplican en múltiples fracciones.

Se realizó un experimento piloto para determinar la dosis de radiación adecuada de los experimentos futuros. Para ello se trataron ratones con tumores A431-WT con fracciones de 2 o 3 Gy durante 10 días y se evaluó el efecto en el tamaño del tumor (Figura 26). Se observó que con una dosis total de 30 Gy, los tumores crecían más lentamente y necesitaban dos veces más tiempo para alcanzar un volumen tumoral equivalente al del los animales no irradiados (datos no mostrados procedentes de un *pool* de tumores no tratados).

Se estableció que la dosis de radioterapia a emplear en este trabajo sería la de 30 Gy en 10 fracciones de 3 Gy.

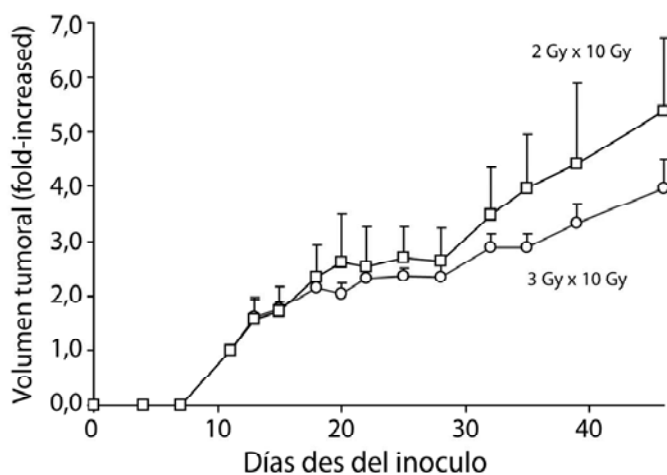


Figura 26. Dosis de radiación *in vivo*. Se inocularon 10^6 células A431-WT en el tejido subcutáneo de la pata derecha de ratones atómicos. Se trataron con una dosis de radioterapia (XRT) de 20 o 30 Gy en 10 fracciones (excepto sábado y domingo). Los valores provienen del promedio de un experimento con 3 ratones \pm SE (20 Gy) y con 2 ratones \pm SE (30 Gy).

A continuación se determinó la sensibilidad de C225 y DST, cada uno de ellos como monoterapia.

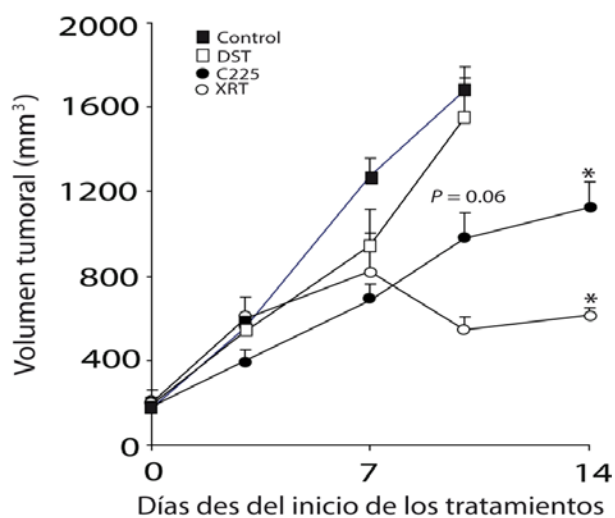


Figura 27. Evaluación del efecto in vivo de los tratamientos en A431-WT. Se inocularon 10^6 células en el tejido subcutáneo de la pata derecha de ratones atímicos. Se trataron con una dosis de radioterapia (XRT) de 30 Gy, con 0.5 mg de C225 o suero fisiológico 2 veces por semana durante 10 días, con 50 mg/Kg/día de DST o vehículo durante 10 días (excepto sábado y domingo). Los valores provienen del promedio de ≥ 5 tumores independientes \pm SE por grupo. * $p < 0.05$ comparado con los controles (Mann-Whitney test).

A día +10, los tumores control y los tumores tratados con DST midieron 1.679 mm^3 y 1.547 mm^3 , respectivamente. Sin embargo (a día +14) los tumores que habían recibido radioterapia o C225 midieron 661 mm^3 y 1.123 mm^3 , respectivamente; diferencia que indicaba un claro efecto terapéutico (Figura 27).

2.2.4. Efecto radiosensibilizador del C225.

La adición del C225 aumentó claramente el efecto antitumoral de la radioterapia en los tumores derivados de ambas líneas celulares, A431 y FaDu. En los tumores procedentes de células A431, a día +35, los tumores tratados con radioterapia y C225 eran 3.5 veces más pequeños que los tratados sólo con radioterapia (Figura 28A). En cuanto a los tumores procedentes de células FaDu, a día +37, los tumores tratados con radioterapia y C225 eran 2.1 veces más pequeños que los tratados sólo con radioterapia (Figura 28B).

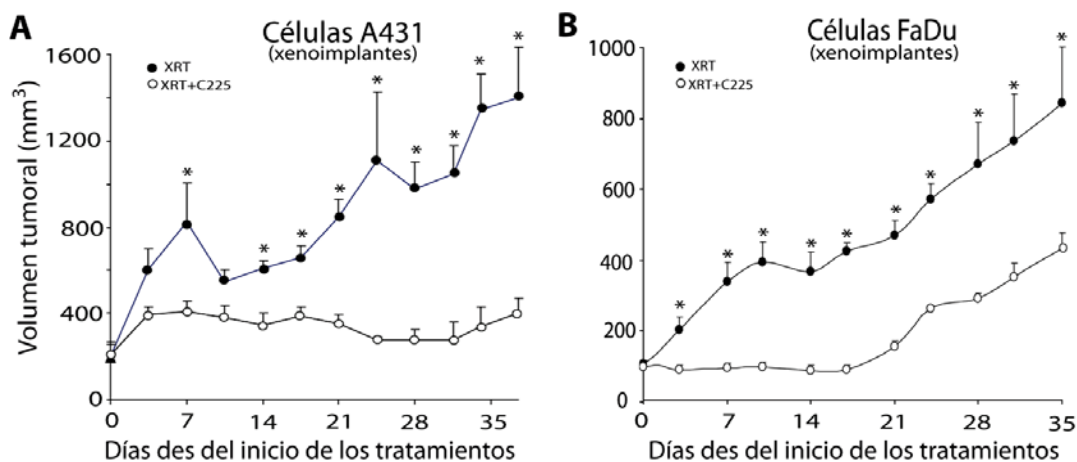


Figura 28. Efecto de la radioterapia combinada con el C225 in vivo. Se aplicó la misma metodología que en la figura 27. Se trataron según Figura 79. Los tratamientos tuvieron una duración de 2 semanas. Los

valores provienen del promedio de ≥ 5 tumores independientes \pm SE por grupo. $*p < 0'05$ comparado con los valores con C225 (*Mann-Whitney test*).

2.2.5. DST contrarresta el efecto antitumoral de la radioterapia combinada con C225.

En los tumores derivados de células A431 o FaDu, se observó que el DST no inducía una disminución del tamaño de los tumores sino al contrario. El crecimiento de los tumores tratados con DST aumentó mientras que aquellos tratados sin DST experimentaron un reducción del progresiva tumor (Figura 29A). A día +21, los tumores de los animales que recibieron radioterapia y C225 presentaban un tamaño tumoral de 213 mm^3 comparado con el tamaño de 547 mm^3 ($p = 0'02$) que mostraban los tumores de los animales a los que además se les dio DST. En FaDu-WT, también observamos el mismo resultado (Figura 29B); a día +21 el tamaño tumoral había alcanzado 156 mm^3 en unos y en los tratados con DST 512 mm^3 ($p = 0'016$).

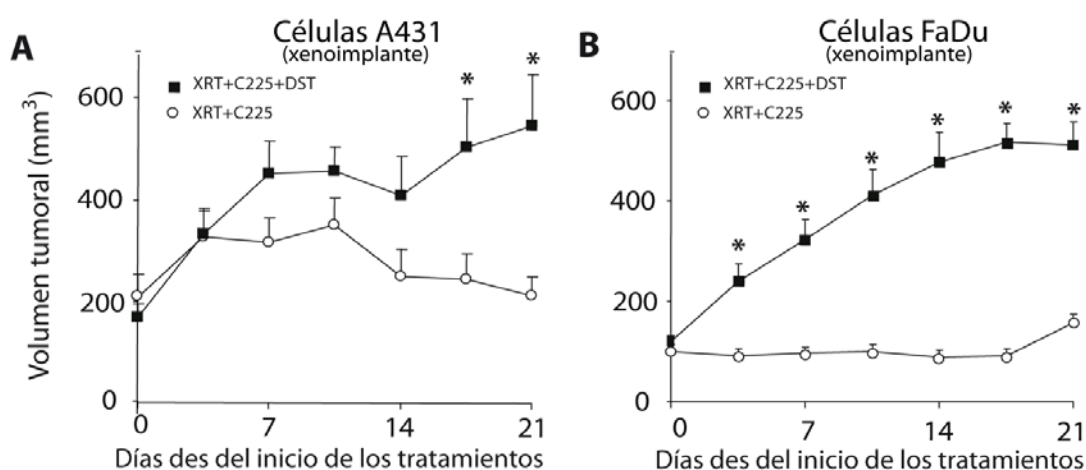


Figura 29. Efecto terapéutico del tratamiento concomitante de XRT, DST y C225 *in vivo*. Se aplicó la misma metodología que en la figura 27, aunque a diferencia de ésta se les administró una dosis de 50 mg/Kg/día de DST 2 h antes de la radioterapia (ver detalles en la Figura 79).



Tras los experimentos *in vivo* quedó establecido, de acuerdo con este modelo experimental, que la adición de DST podría empeorar el control de tumores tratados con cetuximab, tanto si reciben radioterapia como si no. La existencia de esta posibilidad fue motivo de abandonar la idea de continuar evaluando la respuesta antitumoral de dasatinib y se reorientó la investigación hacia la búsqueda de los mecanismos que pudieran explicar el antagonismo, con la esperanza de identificar alguna diana terapéutica.

2.2.6. Dasatinib induce de forma rápida y reversible petequias en ratones atímicos.

En esta parte de la memoria se describe la aparición de hemorragias cutáneas en los ratones tratados con dasatinib, una observación circunstancial que no está directamente relacionada con los objetivos principales del estudio. Sin embargo, en tanto que intrigante, este resultado motivó investigar más allá la naturaleza de las hemorragias observada (Josep Balart, 2011).

La diátesis hemorrágica, un trastorno hematológico que produce sangrado, se observa en un 23 % de los pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con DST. En general, los episodios son suaves o moderados, y suelen consistir en sangrado a nivel de mucosas. La fisiopatología de este sangrado asociado al fármaco se desconoce (Quintas-Cardama *et al.*, 2009).

Observamos que todos los ratones tratados con DST mostraron la presencia de múltiples petequias, las cuales se encontraban distribuidas aleatoriamente a lo largo de toda la piel (Figura 30A). Las petequias aparecieron independientemente de si los animales tenían o no implantado algún tumor. Tampoco se observaron en los ratones tratados con el vehículo (1,2-propanediol). El hallazgo más remarcable fue la rapidez de aparición, 1'5 h después de la administración del DST y su desaparición a las 24 h después del tratamiento. Además, con la administración de una nueva dosis de DST fueron reapareciendo, hecho que se mantuvo a lo largo de los 10 días de duración de los tratamientos. Aun así, la cantidad de petequias disminuyó con el paso de los días (Figura 30B). Los ratones no enfermaron ni siquiera durante el periodo de seguimiento posterior al tratamiento.

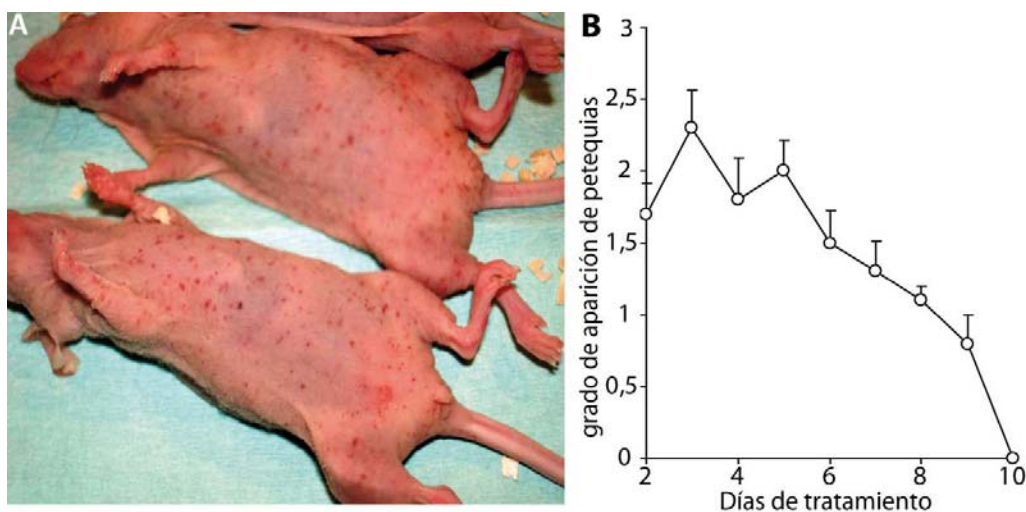


Figura 30. Aspecto y cuantificación de petequias. Los animales se trataron con 50 mg/Kg de DST o vehículo. (A) Aspecto de las petequias 1'5 h después de la dosis de DST. (B) Los símbolos indican el promedio de intensidad de las petequias aparecidas, expresada en grados y las barras el SE (n = 10 ratones). Grados: 0, no aparece ninguna petequia; 1, pocas; 2, entre grado 1 y 3; y grado 3, muchas.

Bajo el microscopio, se confirmó que las manchas rojas de la piel eran de origen hemorrágico (petequias) que correspondían a la extravasación de hematíes alrededor de capilares (Figura 31A). Se descartó que la causa del sangrado fuera el procesado de las muestras y no se visualizó sangrado interno en los órganos. Así, se identificó la aparición de hemosiderina 4 días después de la administración del DST en la piel donde previamente había aparecido petequias, indicando la existencia de una hemorragia previa a la obtención de la muestra (Figura 31B).

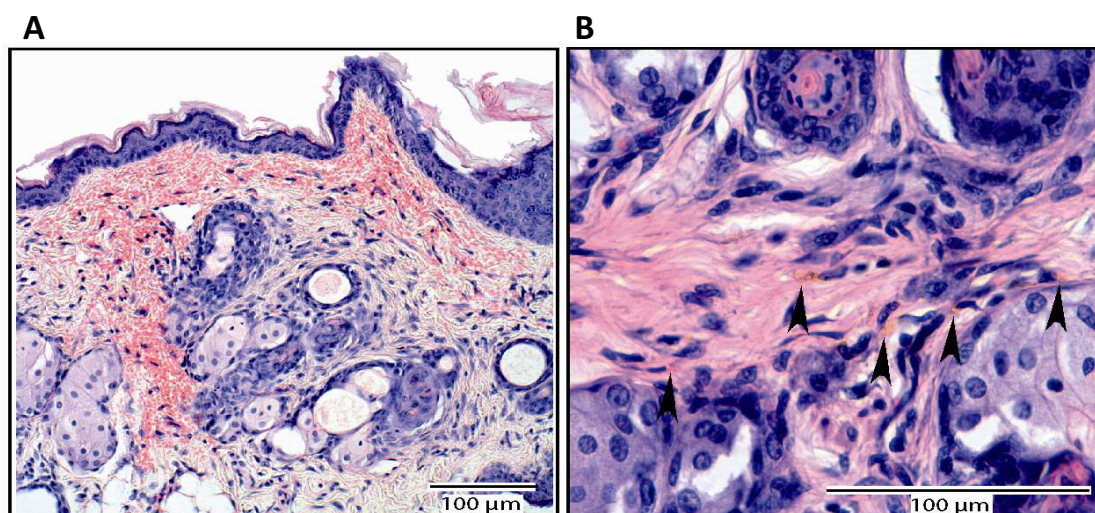


Figura 31. Petequias inducidas por DST en los ratones atímicos. Los animales se trataron oralmente con 50 mg/Kg de DST o vehículo. (A) microfotografías ilustrativas (hematoxilina-eosina, 200x) mostrando hematíes extravasados en el área de la petequia. (B) Visualización de hemosiderina (hematoxilina-eosina, 400x; flechas) en el interior de los macrófagos indicando una hemorragia previa en una muestra extraída del área donde había habido una petequia.



La rápida formación y reversibilidad en las primeras horas del tratamiento junto con la recurrencia de aparición de las petequias después de cada dosis de DST, sugiere un mecanismo de acción asociado a la inactivación de la agregación plaquetaria. Estos resultados se ven reforzados por estudios previos en los cuales DST rápidamente inhibe, aunque de modo reversible, la agregación plaquetaria y aumenta el tiempo de sangrado de la cola de los ratones (Gratacap *et al.*, 2009).

3. CAMBIOS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS

3.1. Resultados *in vitro*.

En esta sección se describirán los cambios inducidos por los tratamientos en algunas proteínas de las vías de señalización relacionadas con el EGFR. También se expondrán los resultados sobre posibles mecanismos de acción que investigamos para explicar el efecto antagónico (los detalles de los esquemas de tratamiento de los western blot realizados en este punto se encuentran en el anexo 1 pagina 178).

3.1.1. La línea celular A431 responde al estímulo del ligando EGF.

Las células A431 se sometieron a distintas concentraciones de EGF (0, 1, 2, 5, 10 o 20 ng/mL) durante de 10 min. Asimismo, se aplicó una dosis fija de 5 ng/mL durante distintos tiempos de incubación (0, 1, 2, 5, 10 o 20 min.).

La estimulación de las A431 indujo la fosforilación de las tirosinas 845, 992 y 1173 del EGFR, así como también la fosforilación del efector *downstream* del receptor, ERK1/2 (Figura 32A).

La dosis de EGF que empleamos en la mayoría de experimentos se fijó en este primer experimento. Ésta fue de 10 ng/mL durante 10 min.

3.1.2 Cambios inducidos por la radiación ionizante en las proteínas EGFR y SRC en A431.

La irradiación de las células A431 con dosis de 1, 2 o 5 Gy produjo la fosforilación de las tirosinas 845, 1068 y 1086 del EGFR (Figura 32B). Esta activación se asoció a una fosforilación y desfosforilación dosis-dependiente de SRC en la tirosina 418 (tirosina responsable de la activación de SRC) y en la tirosina 529 (tirosina responsable de la regulación negativa de SRC), respectivamente (Figura 32B).

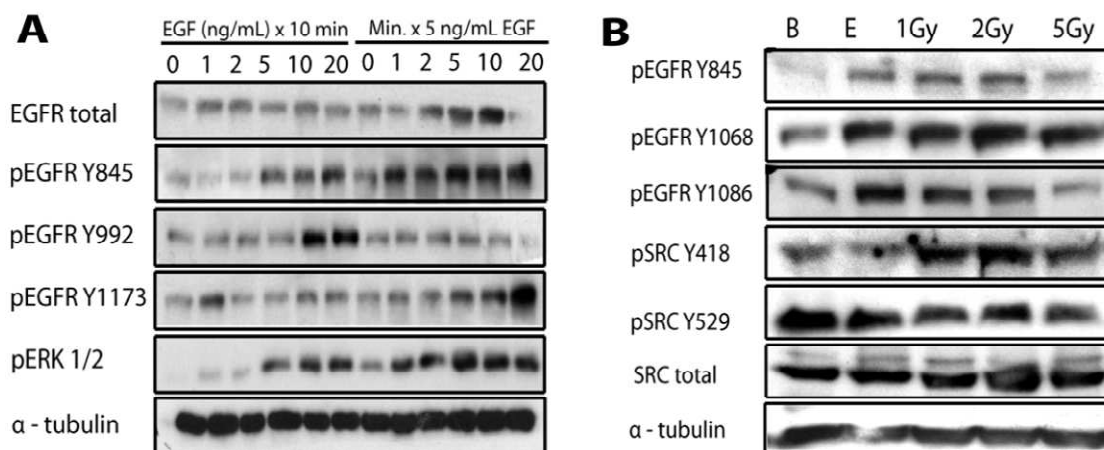


Figura 32. Caracterización mediante WB de la respuesta a EGF y a radiación de distintas fosfoproteínas en las células A431. (A) Respuesta al ligando EGF. Se usaron distintas concentraciones de ligando y distintos tiempos de incubación. Las células se lisaron después del estímulo. Se realizó 1 lisado. (B) Respuesta a la irradiación. E=EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación, 1-5 Gy. Las células se lisaron 15 min. después de la irradiación. Se analizó 1 lisado por duplicado.

3.1.3. Existencia de un mecanismo de cooperación entre SRC y EGFR en la línea A431.

Para valorar si la administración de inhibidores de SRC podría potenciar la radiosensibilización mediada por C225 y confirmar la existencia de una cooperación entre EGFR y SRC en las células A431, se bloqueó SRC con el inhibidor selectivo y específico de la quinasa de SRC, PP2 (5 μM x 16 h).

El PP2 impidió la fosforilación de la tirosina 845 del EGFR inducida por la radiación ionizante (Figura 33). La reducción de la fosforilación de la tirosina 845 por el inhibidor PP2 indica que la fosforilación de esta tirosina inducida por la radiación depende de SRC. Por otra parte, este hecho sugiere que los inhibidores de SRC podrían potenciar a los inhibidores de EGFR.

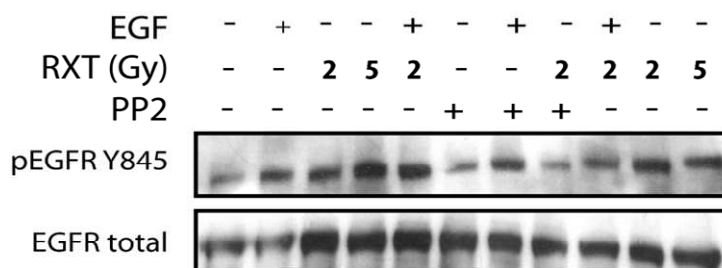


Figura 33. Existencia de un mecanismo de cooperación entre SRC y EGFR en las células A431. Activación del EGFR Y845 en función los distintos tratamientos. EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación (IR), 2 Gy; PP2, 5 μM durante 16 h. Las células se lisaron después de los tratamientos y los extractos proteicos se sometieron a WB. Se realizó un lisado, por duplicado.

3.1.4. Cambios inducidos por los tratamientos en las células A431 resistentes a cetuximab.

Una vez obtenida la línea resistente, se consideró importante establecer si existían diferencias entre ambas líneas (WT y R) y como estaba modulada la respuesta a los tratamientos en la vía de señalización del EGFR. Se analizaron distintas tirosinas del receptor y proteínas *downstream* como ERK y AKT mediante la técnica de Western blot.

3.1.4.1. La línea celular A431-R mostró una disminución de los niveles del receptor EGFR.

La línea A431-R se caracterizó por presentar unos niveles basales y estimulados (EGF o 2 Gy) de receptor total (EGFR) menor al observado en la línea A431-WT (Figura 6). La disminución de los niveles de EGFR se observó también al determinar los niveles de EGFR fosforilado (Figura 34). Además, a diferencia de las células A431-WT, en las células A431-R se observó la ausencia de respuesta al estímulo EGF, sobretodo en la tirosina 992 y en un menor grado en las tirosinas 1068 y 1086.

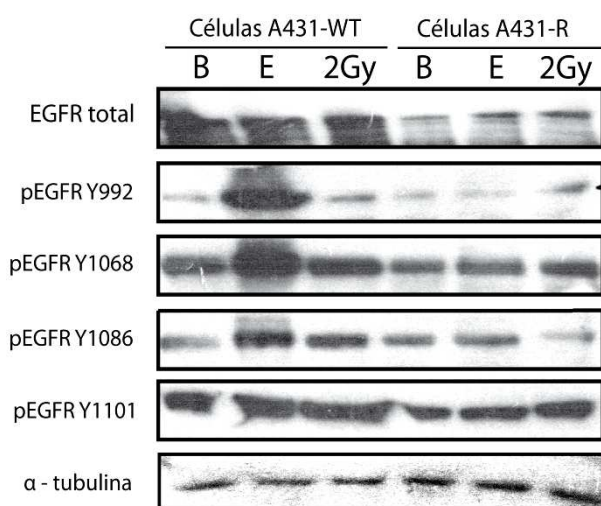


Figura 34. Determinación de los niveles de EGFR en función de distintos tratamientos. EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación, 2 Gy durante 2 min. Las células se lisaron después de los tratamientos y los extractos proteicos se sometieron a WB. Se realizó 1 lisado, por duplicado.

3.1.4.2. El C225 no inhibe la fosforilación de las proteínas EGFR, ERK y AKT en la línea celular A431-R.

Para determinar el efecto del C225 en las vías de señalización de ambas líneas y sobre todo para explorar la respuesta de las proteínas en la línea resistente a C225, se trataron células A431-WT y A431-R con 30 nM de C225. Ni el receptor ni las proteínas *downstream* ERK y AKT fueron inhibidos por el C225 en la línea resistente (Figura 35). Por el contrario, en las células A431-WT el bloqueo de la vía del EGFR fue eficiente, tal y como se esperaba después de ver el efecto antitumoral del anticuerpo en las células A431-WT.

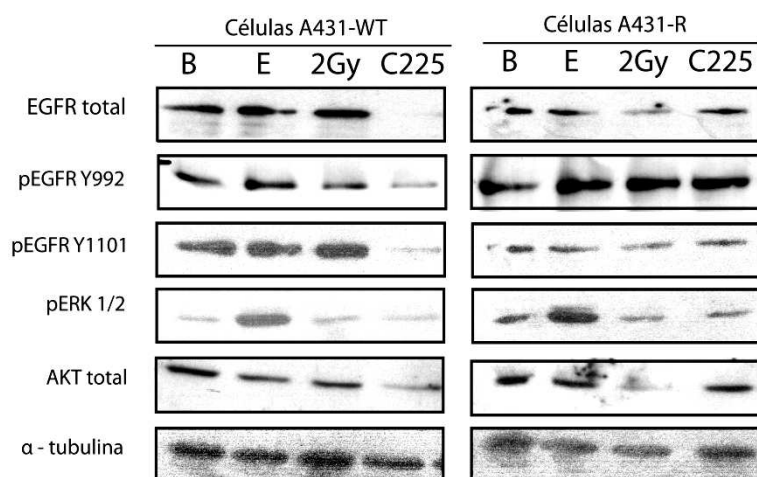


Figura 35. Determinación de la vía del EGFR en función de distintos tratamientos. EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación, 2 Gy durante 2 min.; C225, 30 nM durante 48 h. Las células se lisaron después de los tratamientos y los extractos proteicos se sometieron a WB. Se realizaron 2 lisados independientes.

3.1.4.3. El DST bloquea la quinasa de SRC en las líneas celulares A431-WT y A431-R.

Para determinar si el agente anti-SRC, DST, que queríamos usar para radiosensibilizar las células A431-R realmente inhibía la diana de SRC, se trataron las células con EGF y radiación en presencia o ausencia de DST. Su administración redujo claramente la fosforilación de la tirosina 418 en el dominio catalítico de SRC, sugiriendo la existencia de una potencial aplicación clínica (Figura 36).

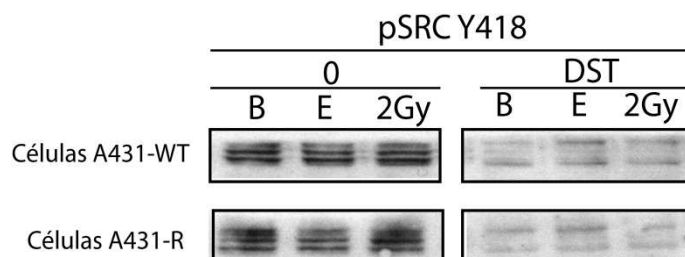


Figura 36. Determinación de los niveles de SRC pY418 en función de distintos tratamientos en células A431 WT y R. EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación, 2 Gy durante 2 min.; DST, 50 nM durante 48 h. Las células se lisaron después de los tratamientos y los extractos proteicos se sometieron a WB. Se realizó 1 lisado, por duplicado.

3.1.4.4. Las células A431-WT y A431-R se comportan de forma distinta frente al DST.

Para explorar los cambios que producía el DST en ambas líneas, se trataron las células A431-WT y A431-R con EGF, radiación y C225 en presencia del DST. La administración de DST no produjo ningún cambio sustancial en las proteínas ERK y AKT respecto a las A431-WT (Figura 37). Por el contrario en la proteína del EGFR, a pesar de no modificarse los niveles totales de receptor se observó, respecto a las A431-WT, un incremento global (en distintas condiciones) de la fosforilación en la tirosina 992 y una disminución de la fosforilación en la tirosina 1101, la cual también es fosforilada por SRC (Figura 37).

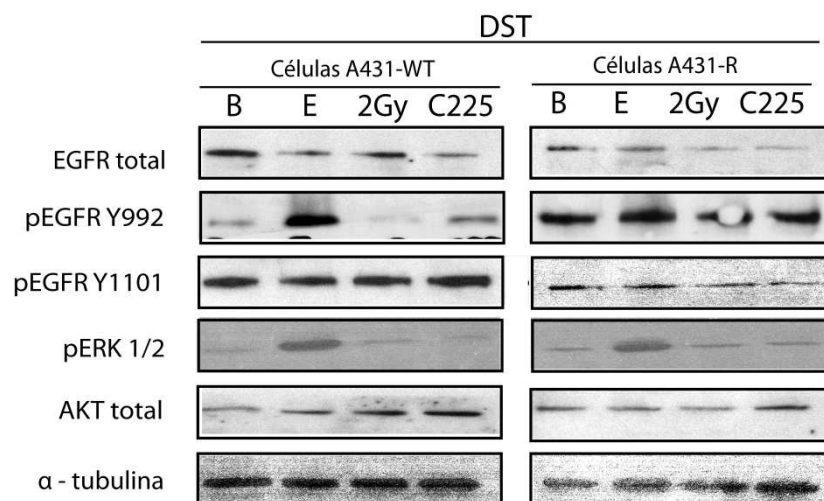


Figura 37. Análisis por WB del inhibidor de SRC en A431-WT y A431-R. EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; Radiación, 2 Gy durante 2 min.; C225, 30 nM durante 48 h; DST, 50 nM durante 48 h. Se lisaron después del tratamiento con radiación y los extractos proteicos se sometieron a WB. Se realizaron 2 lisados independientes.



Al observar en los experimentos de crecimiento tumoral en xenotransplantes que el efecto antagónico se daba tanto en ausencia como en presencia de radiación ionizante y debido a la complejidad para generar muestras irradiadas decidimos proseguir la investigación sobre los mecanismos de acción sin el uso de la radioterapia.

3.1.5 Cambios inducidos por el tratamiento con dasatinib en las proteínas EGFR, SRC, STAT3 y ERK1/2.

Para determinar si el efecto del tratamiento concomitante de C225 y DST en las vías de señalización era consecuencia directa de la inhibición de SRC, las células A431 y FaDu WT se trataron con EGF (10 ng/mL de 0 a 30 min.) en ausencia o presencia de DST (150 nM x 48 h).

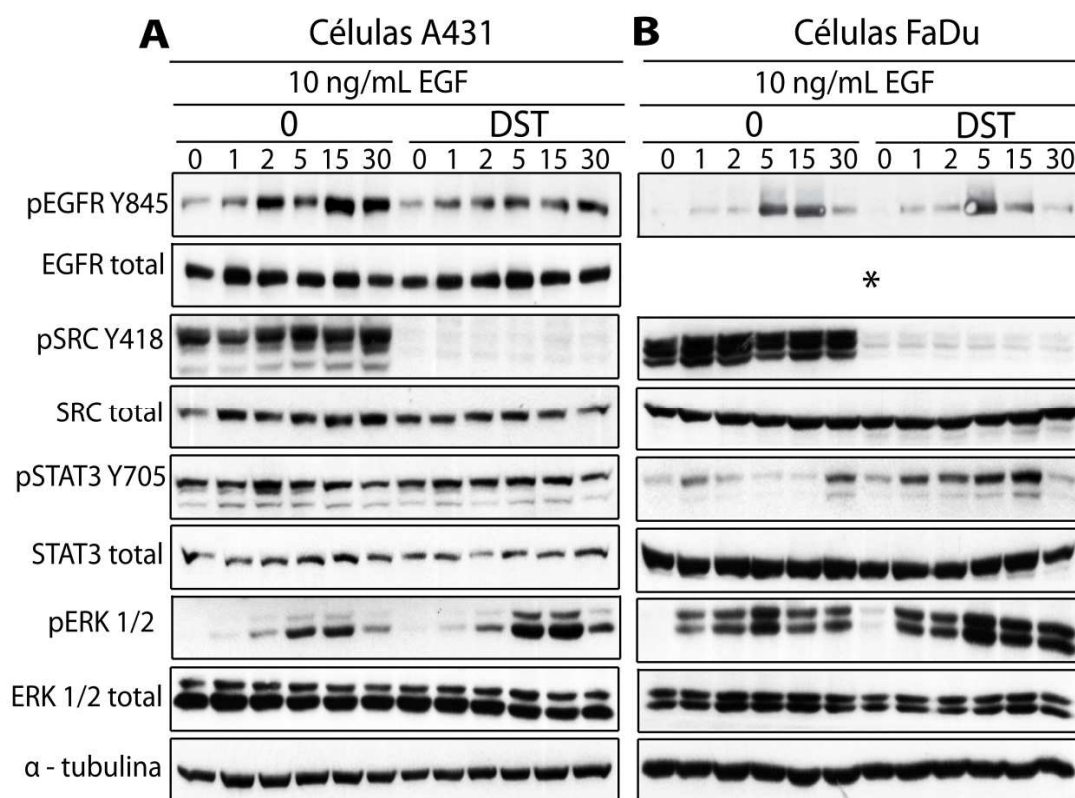


Figura 38. Efecto de la inhibición de SRC en las vías de señalización. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF en presencia o ausencia de DST analizados por WB. EGF, 10 ng/mL con incubaciones entre 0 y 30 min. DST, 150 nM durante 48 h. Se realizaron 2 lisados independientes, por duplicado para cada línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados de la línea celular FaDu.

En ambas líneas celulares, se observó que DST inhibía la proteína SRC; tal y como se evidenciaba por los bajos niveles de fosforilación de la tirosina 418 del dominio quinasa de SRC, el cual es el criterio de inhibición farmacológica usado en los estudios realizados en DST (Luo *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006) (Figura 38). Debido a que el residuo Y845 del EGFR se fosforila por la quinasa de SRC en vez de por el propio receptor, se determinaron su niveles para confirmar la inhibición funcional de SRC. En ambas líneas celulares, la administración de DST provocó una disminución de los niveles de fosforilación de esta tirosina del EGFR entre los 0 y 30 min. (Figura 38).

A pesar de inhibir la fosforilación de la tirosina 845 del EGFR, esto no se reflejó *downstream* ya que la administración de DST indujo una significativa y paradójica elevación de los niveles de pERK1/2 en ambas líneas, mayor aún de la observada con el ligando EGF solo (Figura 38).

Además, se observaron modificaciones en la vía de STAT3. En la línea A431, mientras el ligando disminuyó la fosforilación de la tirosina 705, la administración de DST revirtió este efecto (Figura 38A). En la línea FaDu-WT, a diferencia de las A431, el tratamiento con ligando no modificó los niveles basales de la pY705 pero cuando se añadió DST estos niveles se vieron incrementados (Figura 38B).

3.1.6 Cambios inducidos por el tratamiento de dasatinib, cetuximab y AG1478 sobre SRC, EGFR, AKT, ERK1/2 y STAT3.

3.1.6.1. Cambios inducidos por dasatinib en combinación con cetuximab en la proteína SRC.

Se observó que, independientemente del tratamiento con que se combinó, DST inhibió la fosforilación de la tirosina activadora de SRC, Y418, y la fosforilación de la tirosina responsable de la regulación negativa de SRC, Y529. La inhibición de SRC se asoció a una disminución de la fosforilación de la tirosina 466 de la Cortactina, la cual es un sustrato específico de SRC (Tehrani *et al.*, 2007) (Figura 39).

Dado que se ha descrito que SRC puede fosforilar la proteína Caveolina en la tirosina 14 y ello constituye un paso necesario para el transporte al núcleo de EGFR (Dittmann *et al.*, 2008), decidimos examinar si DST ejercía algún cambio en los niveles de fosforilación de esta proteína. Ninguno de los tratamientos modificó de modo significativo los niveles basales de la pY14 de la Caveolina en ambas líneas celulares (Figura 39).

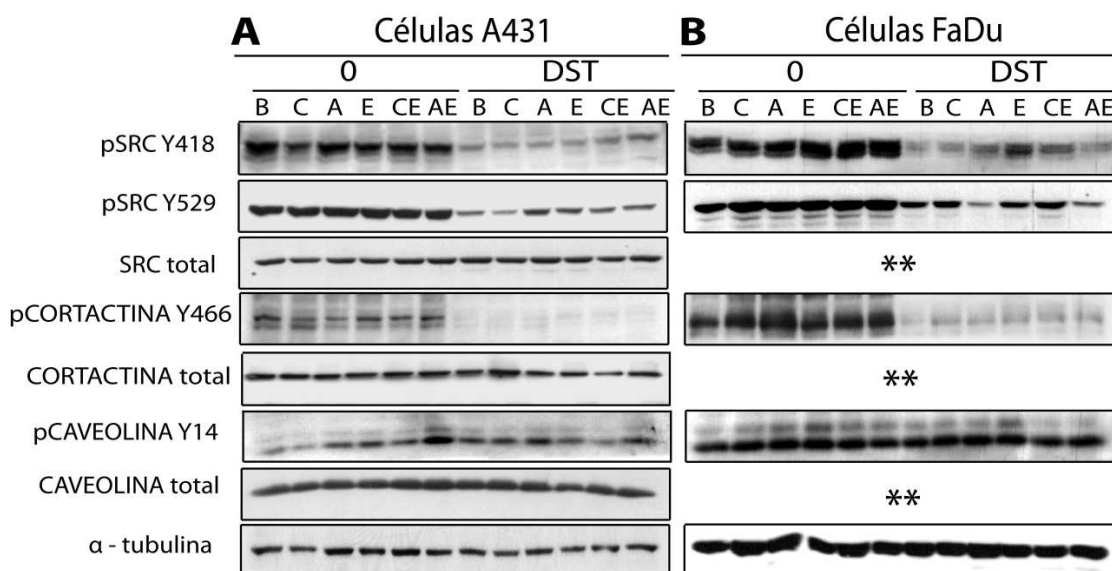


Figura 39. La inhibición concomitante de EGFR y SRC indujo cambios en la regulación de SRC y de la Cortactina. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF, C225 o AG1478 en presencia o ausencia de DST analizados por WB. B, vehículo; C, C225 30 nM durante 48 h; E, EGF 10 ng/mL durante 10 min.; A, AG1478 100 nM durante 2 h; DST, 150 nM durante 48 h. Se realizaron 3 lisados

independientes, por duplicado, para A431 y 4, por duplicado, para FaDu. **No se evaluaron estas proteínas.

3.1.6.2. Cambios inducidos por dasatinib en combinación con cetuximab en la proteína EGFR.

Se examinaron los cambios producidos por los tratamientos en la vía del EGFR evaluando los niveles totales del receptor del EGF y de su fosforilación en la tirosina 845, activada por la quinasa de SRC, y en la tirosina 1068, activada por el propio EGFR.

En la línea celular A431, a nivel del receptor el tratamiento con C225 inhibió los niveles de EGFR total pero estos no se vieron modificados con la administración de DST (Figura 40A). Mientras que la administración de C225 no inducía cambios en la fosforilación de la tirosina 845, disminuyó los niveles fosforilados de la tirosina 1068. Independientemente del tratamiento con que se combinara, la administración de DST disminuyó los niveles fosforilados de la tirosina 845 y aumentó los de la tirosina 1068 (Figura 40A). En las células FaDu, la inhibición de la fosforilación de Y845 y Y1068 por cetuximab fue mayor, pero se reprodujo el incremento de pY1068 en presencia de DST (Figura 40B).

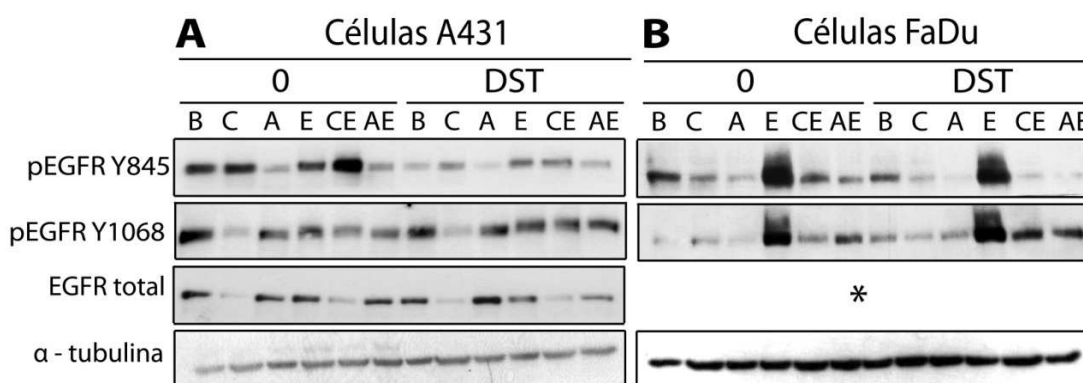


Figura 40. La inhibición concomitante de EGFR y SRC indujo cambios en la proteína EGFR. Igual que la Figura 39 pero para las proteínas indicadas. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados de la línea celular FaDu.

3.1.6.3. Cambios inducidos por dasatinib en combinación con cetuximab en las proteínas ERK1/2 y AKT.

Para determinar el efecto de la inhibición de SRC sobre la señalización *downstream* de EGFR en células tratadas con cetuximab, se midieron los niveles de las proteínas ERK1/2 y AKT.

En ambas líneas celulares no se observaron cambios en los niveles de las proteínas totales ERK1/2 y AKT. La administración de EGF causó un aumento de los niveles de pERK1/2 y pAKT, que la administración de C225 no modificó sensiblemente. Consistente con el aumento de fosforilación de ERK1/2 observado tras la administración de EGF y DST (Figura 38), el

tratamiento con DST y C225 indujo un incremento de la fosforilación de ERK1/2 y AKT que contrastó con la fosforilación de ambas proteínas bajo la exposición con C225 exclusivamente (Figura 41).

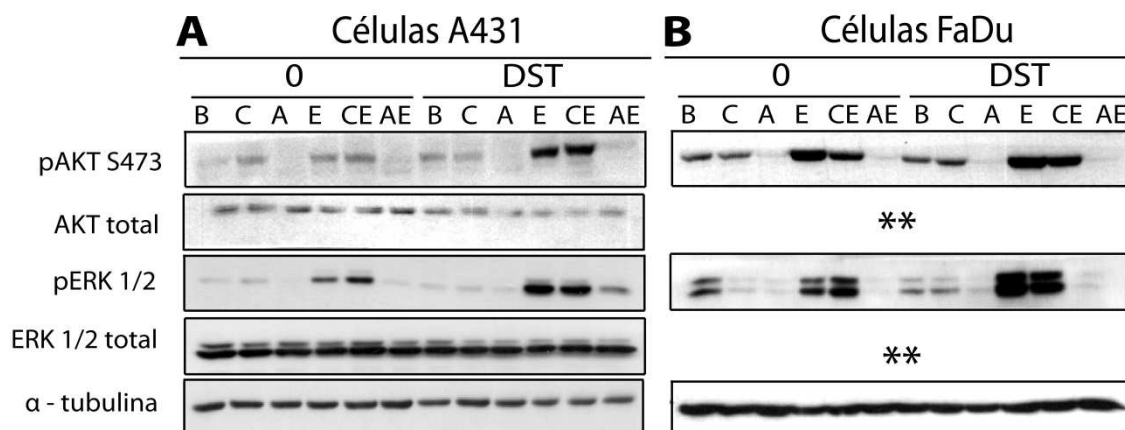


Figura 41. La inhibición concomitante de EGFR y SRC indujo cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 39 pero para las proteínas indicadas. **No se evaluaron estas proteínas.

3.1.6.4. Cambios inducidos por dasatinib en combinación con cetuximab en la proteína STAT3.

Dado que se ha descrito la reactivación de STAT3 horas después de la administración de DST y que JAK es una posible vía de resistencia al tratamiento con DST (Byers *et al.*, 2009; Caccia *et al.*, 2010; Nagaraj *et al.*, 2011), examinamos los niveles de esta proteína para determinar si podía tener algún papel en el efecto antagónico observado *in vivo*. Se determinaron los niveles totales y fosforilados de la proteína STAT3, tanto en la tirosina 705 (responsable de la activación de STAT3, de la dimerización, la traslocación nuclear y la unión del ADN) como en la serina 727 (responsable de la regulación transcripcional de STAT3 a través de las vías de MAPK y mTOR).

En ambas líneas celulares, se observó que, independientemente del tratamiento administrado, no había ninguna modificación en los niveles totales de STAT3 (Figura 42). En la línea celular A431, los niveles de la pY705 disminuyeron en presencia del ligando EGF y aumentaron en presencia de C225. La administración de DST revirtió el efecto del ligando y aumentó aún más los niveles adquiridos por el tratamiento con C225. Respecto a la pS727 se observó que la administración de DST inducía un aumento de sus niveles fosforilados (Figura 42A).

En la línea celular FaDu, no se observó una disminución de los niveles de fosforilación con el ligando. Sin embargo se observó un incremento notable de la fosforilación de la tirosina 705 y de la serina 727 inducido por el DST, sobretudo en presencia de ligando (Figura 42B).

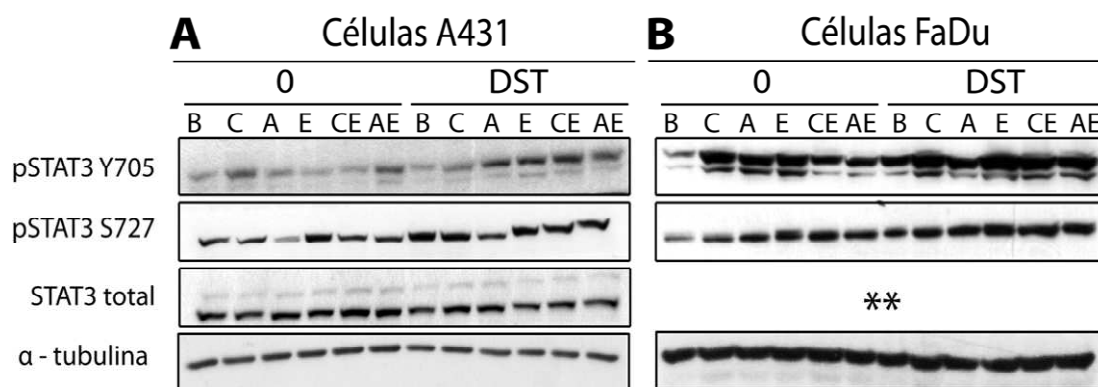


Figura 42. La inhibición concomitante de EGFR y SRC indujo cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 39 pero para las proteínas indicadas. **No se evaluaron estas proteínas.

3.1.6.5. Diferencias entre los efectos de C225 y AG1478 en A431 y FaDu WT.

Existen dos estrategias terapéuticas para inhibir el EGFR y la señalización *downstream*: los anticuerpos monoclonales como C225 que compiten con el ligando para unirse al receptor e inhibir la activación inducida por ligando, y los inhibidores tirosina quinasa como erlotinib y gefitinib que se unen al dominio quinasa intracelular inhibiendo el receptor (Ciardiello and Tortora, 2008; Harari, 2004). La molécula AG1478 es un inhibidor directo de tirosina quinasa que, a diferencia de C225, la inhibe indirectamente tras competir con los ligandos de EGFR. AG478 inhibió la fosforilación de pERK1/2 y pAKT independientemente de la presencia de DST en ambas líneas celulares (Figura 41). Otras diferencias que se observaron entre C225 y AG1478, aunque no siempre coincidían entre ambas líneas celulares, tuvieron lugar a nivel de las proteínas EGFR y STAT3. A pesar de que los niveles de EGFR total no se vieron modificados con la administración de AG1478 en la línea celular A431, sí disminuyeron los niveles de EGFR pY1068 y EGFR pY845. Estos resultados se reprodujeron en la línea celular FaDu, pero el grado de disminución no fue tan marcado; hay que recordar que las células FaDu responden más que las A431 al C225 (Figura 40).

Respecto a la proteína STAT3, no se observaron diferencias entre los inhibidores de EGFR ya que ambos aumentaban los niveles de fosforilación de la tirosina 705 y de la serina 727 excepto en la línea celular A431 que el inhibidor AG1478 disminuía los niveles de la pS727 (Figura 42). Por último, en las proteínas SRC, Cortactina y Caveolina no se observaron diferencias entre los inhibidores de EGFR (Figura 39).

En la tabla 15 se describe el efecto comparativo de los dos inhibidores de EGFR en las proteínas EGFR, SRC, STAT3, ERK y AKT analizadas por WB. También se describe el

comportamiento de estas mismas proteínas cuando los inhibidores de EGFR se combinan con DST.

Tabla 15. Efecto en las proteínas indicadas de los inhibidores de EGFR en ausencia o presencia de DST.

Proteínas evaluadas	C225	AG1478	C225+DST	AG1478+DST
<i>Células A431-WT</i>				
EGFR total	↓	=	↓	=
pEGFR Y845	=	↓	↓	↓↓
pEGFR Y1068	↓↓	↓	↑	↑
pERK1/2	↑	↓	↑↑	↓
pAKT S473	↑	↓	↑↑	↓
pSTAT3 Y705	↑	↑	↑↑	↑↑
pSTAT3 S727	↑	↓	↑↑	↑
<i>Células FaDu-WT</i>				
pEGFR Y845	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓
pEGFR Y1068	↓	↓↓	↑	↑
pERK1/2	↑	↓	↑↑	↓
pAKT S473	↑	↓	↑↑	↓
pSTAT3 Y705	↑	↑	↑↑	↑↑
pSTAT3 S727	↑	↑	↑↑	↑↑

Las flechas indican el grado de cambio en la fosforilación de las proteínas indicadas según los tratamientos en relación al control. Símbolos: =, no se modifican los niveles; ↓, disminución de los niveles; y ↑, aumento de los niveles. El número de flechas aumenta según el grado de aumento o disminución de la fosforilación.

3.1.7. DST no aumenta los niveles disponibles de EGFR.

El efecto antagónico del DST podría proceder de una actividad aberrante del propio EGFR el cual podría inducir una disminución en la internalización del EGFR que a su vez daría lugar a una mayor disponibilidad de moléculas EGFR en la superficie celular a punto para ser activadas por los ligandos de EGFR (Li *et al.*, 2009).

Para contrastar esta hipótesis, las células A431 se marcaron con C225-FTIC y se trataron con C225 (30 nM), DST (50 nM) o ambos durante 48 h (ver detalles en anexo 1, pagina 174). Mediante citometría de flujo se determinaron los niveles de EGFR-C225-FTIC. Se observó que la administración del DST no incrementó la cantidad de EGFR en la superficie celular (las

células no se permeabilizaron). Estos resultados se replicaron cuando las células se trataron con C225 o C225 y DST, con o sin estimularlas con ligando EGF (2 ng/mL x 30 min.) (Figura 43).

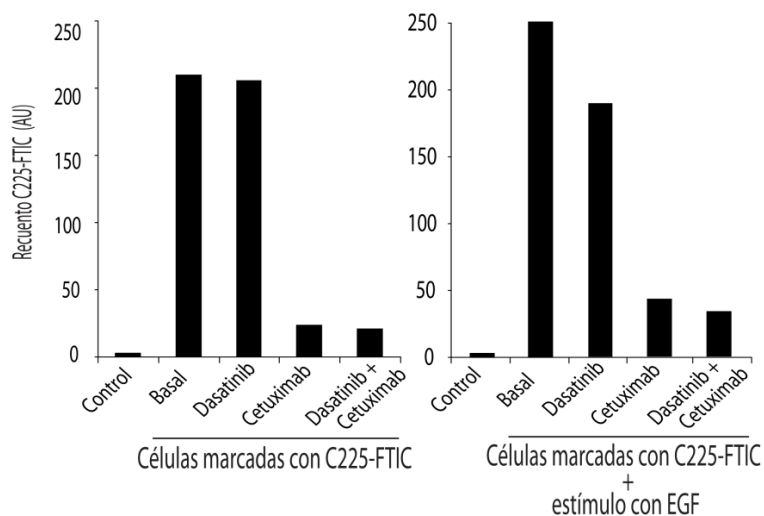


Figura 43. El efecto paradójico del DST no es atribuible a un incremento del EGFR en la superficie celular. Las células A431 en medio con FBS al 10 % se trataron con 30 nM de C225, 50 nM de DST o con ambos durante 48 h. Después se trataron en ausencia o presencia de ligando EGF (2 ng/mL durante 30 min.). Las células se incubaron con C225-FTIC (15 min. a 4°C) y después de su marcaje se analizaron mediante citometría de flujo.

3.1.8. El tratamiento con PP2 reproduce los cambios inducidos por dasatinib.

El dasatinib inhibe múltiples dianas como Bcr-Abl, SRC, cKIT, PDGFR α y β , efrinas, receptores con dominio discoidina 1 (DDR1) y receptor del factor estimulante de colonia-1 (c-FMS) (Montero *et al.*, 2011). Lógicamente, para concluir que los cambios inducidos por DST eran consecuencia directa de la inhibición de SRC fue necesario confirmar que los resultados de los puntos 3.1.5 y 3.1.6 podían reproducirse mediante el uso de un inhibidor específico y selectivo de SRC, el PP2.

A pesar de que la inhibición de la pY418 de SRC fue menor con PP2, los resultados observados con DST en EGFR, SRC, AKT, ERK1/2 y STAT3 fueron reproducidos con PP2 ya fuera como monoterapia o en combinación con los inhibidores de EGFR, C225 y AG1478 (ver Figuras 83-87 del anexo 2 página 182).

3.1.9 Efecto del dasatinib (\pm C225) en combinación con un inhibidor de JAK.

Como hemos mencionado anteriormente, algunos estudios han descrito que el receptor tirosina-quinasa de la proteína *Janus-activated kinase* (JAK) está asociado con la resistencia a DST y puede activar directamente la proteína STAT3 (Byers *et al.*, 2009; Caccia *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2007). STAT3 la hemos visto su implicada en el efecto paradójico de DST. Esto nos llevó a determinar si un inhibidor de JAK, pyridone 6 (P6), podía contrarrestar los efectos del DST en A431 y FaDu WT.

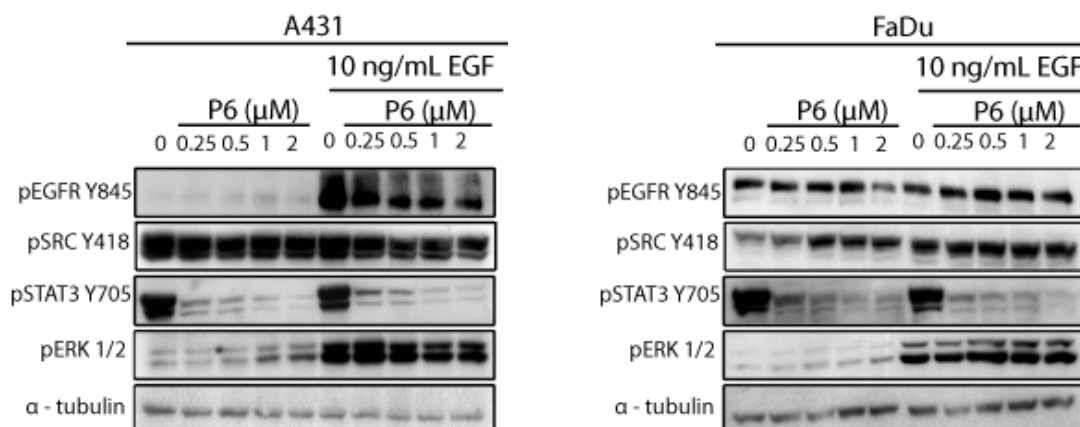


Figura 44. Dosis-respuesta frente al inhibidor de JAK. Lisados de células A431 y FaDu tratadas con pyridone 6 (0, 0'25, 0'5, 1 y 2 μ M durante 2 h) en presencia o ausencia del ligando EGF (10 ng/mL x 10 min.) analizados por WB. P6, pyridone 6. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular.

Para ello, primero se trataron las células A431 y FaDu con dosis crecientes del P6 (0'25, 0'5, 1 y 2 μ M x 2 h) en ausencia o presencia de ligando EGF (10 ng/mL x 10 min.) para determinar una dosis del inhibidor con la que se inhibiera STAT3 en la pY705 sin inhibir pERK1/2. En ambas líneas celulares obtuvimos el efecto que buscábamos con una dosis de 0'25 μ M (Figura 44).

3.1.9.1. P6 y DST: su combinación no revierte el efecto paradójico inducido por DST.

Antes de evaluar el estado de activación de AKT y ERK en presencia de DST y P6 se determinaron los niveles de activación de EGFR y SRC en estas condiciones. En las células A431, el tratamiento con P6 incrementó los niveles de pEGFR Y845 y pEGFR Y1068. Al añadir DST el grado de fosforilación de ambas tirosinas disminuyó, sobre todo el de la Y845 (Figura 45A). En las células FaDu se observó un aumento de fosforilación de EGFR Y845 en presencia de P6 (Figura 45B).

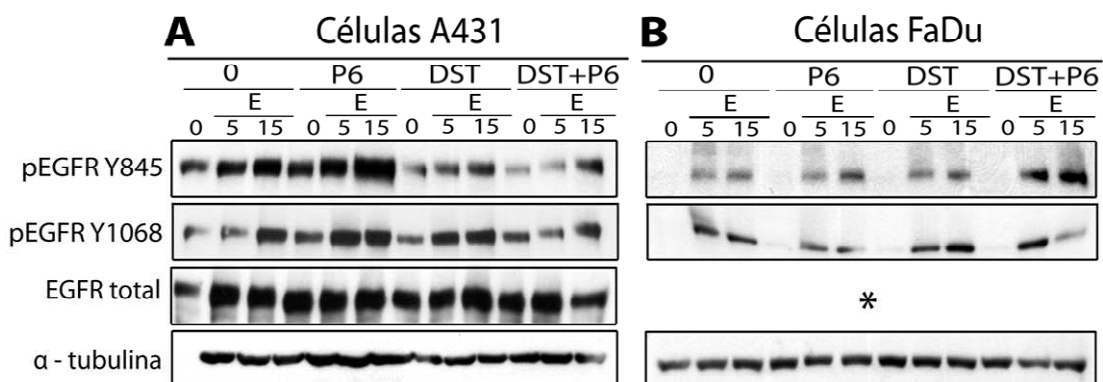


Figura 45. La inhibición concomitante de JAK y SRC indujo cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con P6, EGF, DST analizados por WB. P6, Pyridone 6 0'25 μ M

durante 2 h; E, EGF 10 ng/mL durante 0, 5 o 15 min.; DST, 150 nM durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados indicados.

En cuanto a SRC, se vio un aumento inducido por P6 de la función quinasa, evidenciándose esto a nivel de pCortactina Y466 y pSRC Y418 (Figura 46), y en consonancia con un mayor grado de activación de EGFR Y845 (Figura 45). DST, sin embargo, inhibió SRC incluso en presencia de P6.

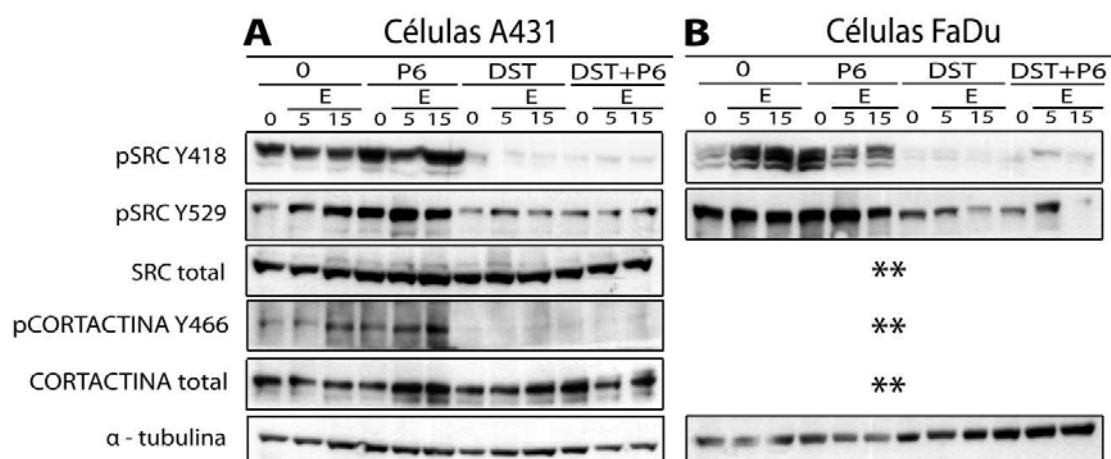


Figura 46. La inhibición concomitante de JAK y SRC indujo cambios en la regulación de SRC y Cortactina. Igual que la Figura 45 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

En lo que se refiere a AKT, P6 no modificó su fosforilación (Figura 47). Sin embargo, el tratamiento con P6 causó un incremento de la fosforilación de ERK1/2 (Figura 47). El efecto paradójico de DST sobre AKT y ERK1/2, ya observado previamente, y en contra de lo que imaginábamos, no tan sólo no mejoró al añadir P6 al DST, sino que empeoró, observándose un aumento notable de la fosforilación de ambas proteínas (Figura 47).

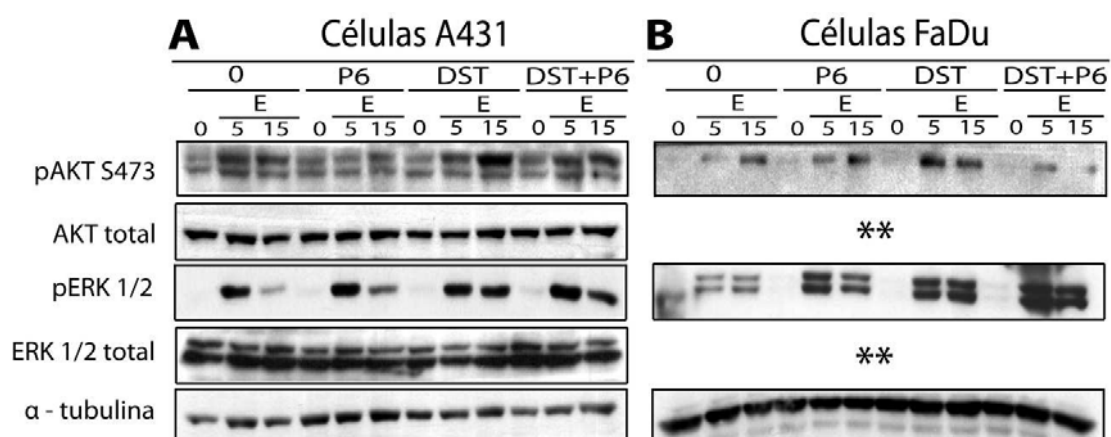


Figura 47. La inhibición concomitante de EGFR y SRC indujo cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 45 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

Finalmente, a nivel de STAT3 en las células A431, el tratamiento con P6 inhibió la fosforilación de la tirosina 705. El tratamiento con DST o P6 a modo individual incrementó los niveles fosforilados de la serina 727, la combinación de ambos hizo disminuir sus niveles fosforilados hasta un estado basal (Figura 48A). En las células FaDu el tratamiento con P6, combinado o no con DST, inhibió los niveles de la pY705. Los niveles de la pS727 se vieron incrementados cuando el P6 se combinó con DST (Figura 48B).

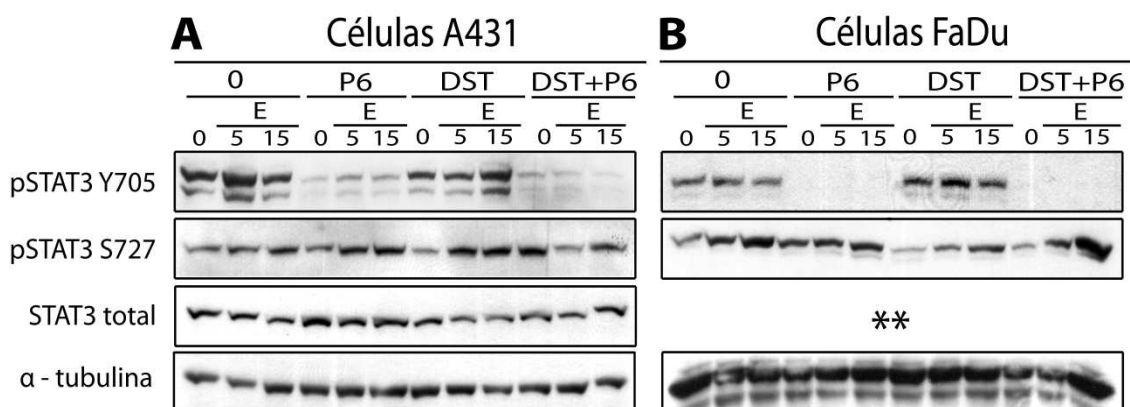


Figura 48. La inhibición concomitante de JAK y SRC indujo cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 45 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

3.1.9.2. P6 y C225: su combinación no revierte el efecto paradójico producido por DST en la línea A431, sin embargo, lo revierte en la línea FaDu-WT.

A nivel de EGFR, y como se había observado previamente, el DST disminuyó los niveles de la pY845 y aumentó los niveles de la pY1068. Sin embargo, cuando se combinaron P6, DST y C225 se inhibió la fosforilación de ambas tirosinas, sobre todo con el AG1478, (Figura 49).

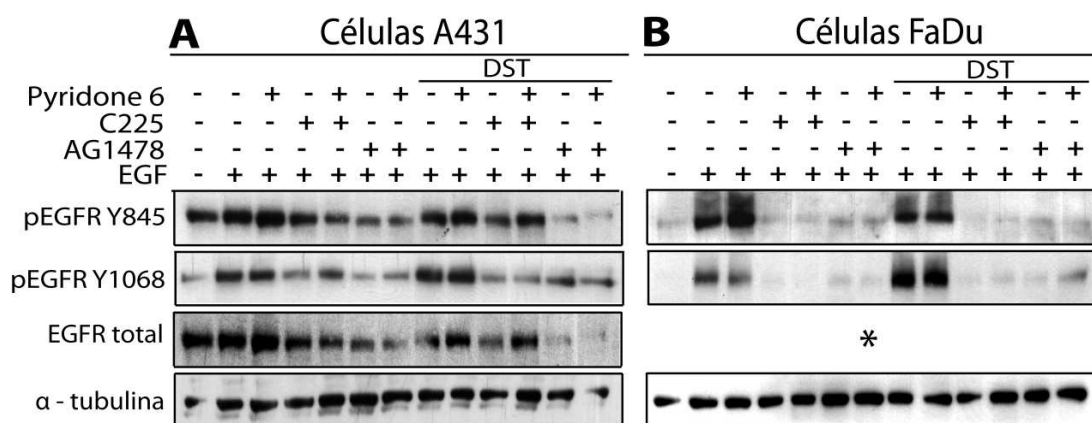


Figura 49. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC indujo cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con P6, EGF, C225 o AG1478 en presencia o ausencia de DST analizados por WB. Pyridone 6, 0'25 μ M durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; C225, 30 nM durante 48 h; AG1478, 100 nM durante 2 h; DST, 150 nM durante 48 h.. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados indicados.

A nivel de SRC, en ambas líneas celulares se observó la inhibición de la fosforilación de las tirosinas 418 y 529 de SRC, y de la tirosina 466 de la Cortactina como en los resultados anteriores. (Figura 50).

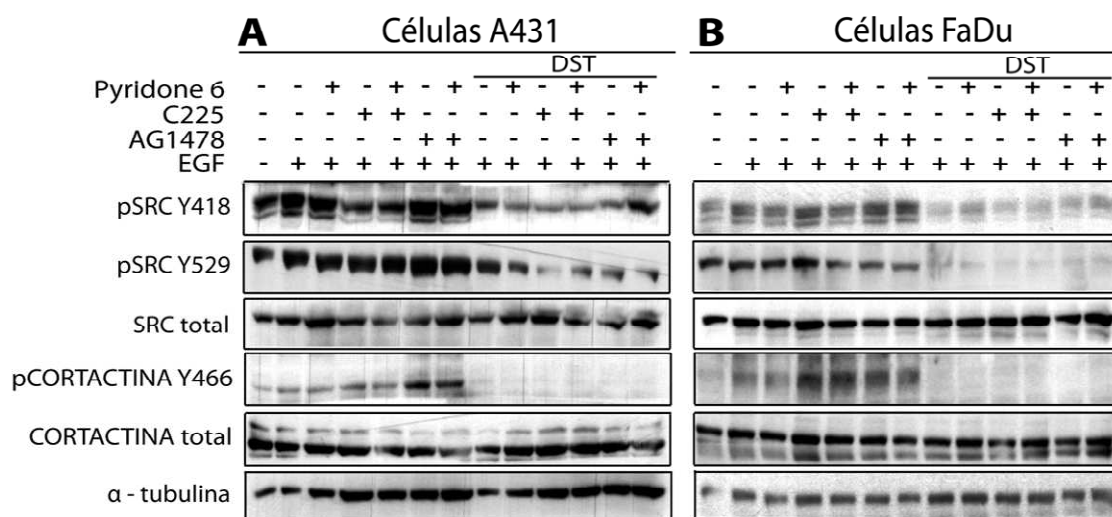


Figura 50. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC indujo cambios en la regulación de SRC y Cortactina. Igual que la Figura 49 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de ERK y AKT, en las células A431 la administración de P6 a cualquiera de los tratamientos no modificó el efecto antagónico inducido por DST en la fosforilación de ERK1/2 y de AKT, excepto cuando estos se combinaron con AG1478 que los inhibió (Figura 51A), en consonancia con la Figura 41. En las células FaDu, la administración del P6 a la combinación de C225 y DST inhibió la fosforilación inducida por DST en ambas proteínas (ERK1/2 y AKT). El efecto observado en las células A431 con el inhibidor AG1478 también se observó en FaDu (Figura 51B).

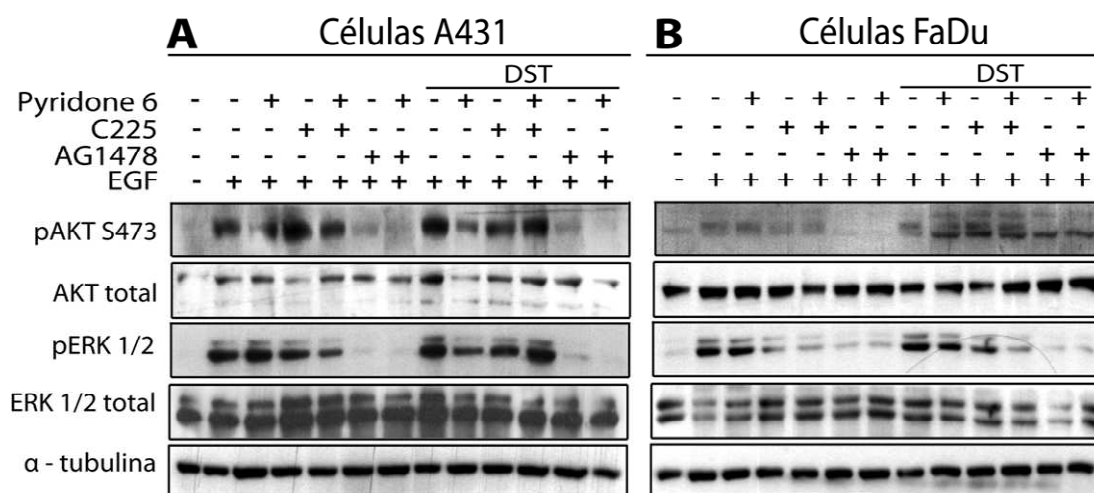


Figura 51. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC indujo cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 49 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de STAT3, en las células A431 la administración del P6 inhibió la fosforilación de la tirosina 705, resultado que también se observó en la línea FaDu. En la serina 727 no se observaron cambios significativos entre los distintos tratamientos excepto con la combinación de AG1478, DST y P6 que inhibió sus niveles fosforilados (Figura 52A). A diferencia de las células A431, en las células FaDu se observó un aumento significativo de la pY705 y de la pS727 con la administración de DST (Figura 52B).

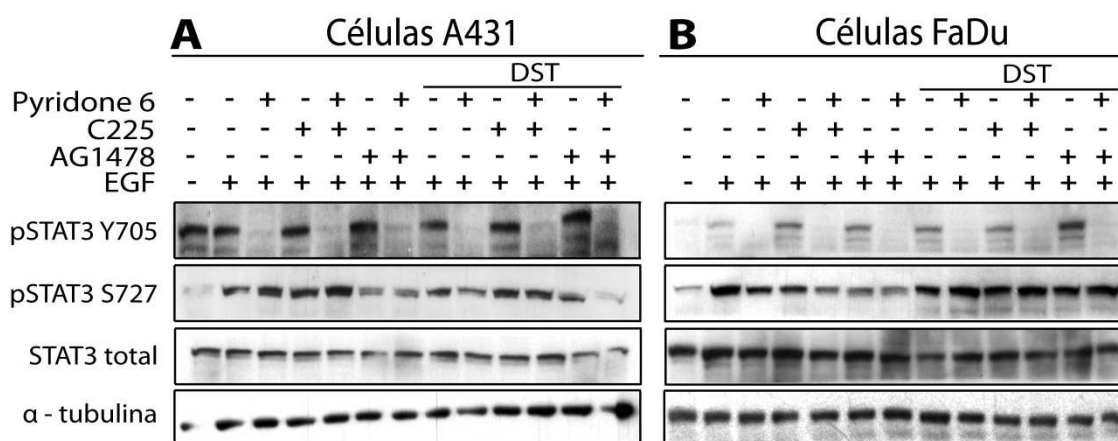


Figura 52. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC indujo cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 49 pero para las proteínas indicadas.

3.1.9.3. La administración del inhibidor de JAK (\pm C225) no revierte el efecto paradójico inducido por PP2.

Del mismo modo que se estableció que el efecto antagónico del DST se reproducía con PP2, evaluamos si se reproducían los efectos del bloqueo simultáneo de SRC y JAK (\pm C225) al sustituir DST por PP2 y de esta forma confirmar que dependían del bloqueo de SRC. En las Figuras 88-95 del Anexo 2 (pagina 184) se muestra que el tratamiento con DST o PP2 en combinación con P6 con o sin C225 tiene uno efecto antagónico equivalente sobre pERK1/2 y pAKT, lo que permite concluir que el mecanismo de acción subyacente se relaciona directamente con el bloqueo de SRC (al ser PP2 un inhibidor mucho más específico que DST). Se observaron algunas diferencias entre DST y PP2 en cuanto a los niveles de fosforilación de SRC en la tirosina 418 y EGFR en la tirosina 1068 que fueron algo menores que con DST.

3.1.10. Efecto de la inhibición de SRC en combinación con un inhibidor de cMET.

Recientemente, en algunos estudios se ha descrito que la resistencia a la inhibición de SRC podría estar relacionada con el receptor tirosina quinasa transmembrana cMET (Okamoto *et al.*, 2010; Sen *et al.*, 2010), razón por la cual decidimos testar si el inhibidor de cMET PHA665752 revertiría el efecto producido por el DST.

3.1.10.1. La administración del inhibidor de cMET no revierte el efecto paradójico del DST.

Para establecer el efecto de la inhibición concomitante de SRC y cMET, se trataron A431 y FaDu WT con dosis crecientes del inhibidor PHA665752 (100, 500 o 1500 nM x 2 h) y con EGF (10 ng/mL x 10 min.) en ausencia o presencia de DST (150 nM x 48 h).

En cuanto a EGFR, en las células A431 no se observaron cambios en los niveles de la tirosina pY845 (Figura 53A). En las células FaDu, la administración de DST y anti-MET indujo un incremento, dosis dependiente, de los niveles de la pY845 (Figura 53B), aunque el ajuste por el control de tubulina no lo permite afirmar taxativamente. Mientras en la línea celular A431 observamos que el tratamiento con DST solo, incrementó los niveles de la pY1068; en la línea celular FaDu no se observaron cambios respecto al vehículo. Aun así, tanto en las células A431 como en las células FaDu, los niveles alcanzados en la tirosina 1068 con DST no se inhibieron cuando se combinó con el inhibidor de MET (Figura 53).

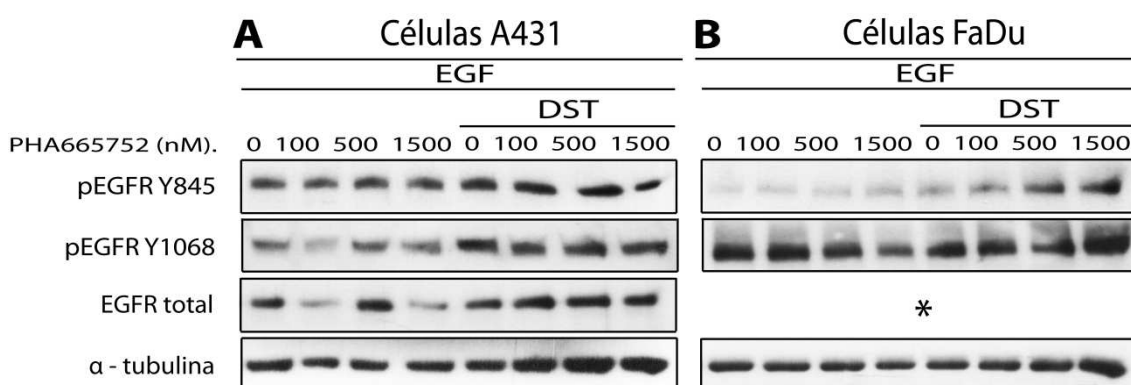


Figura 53. La inhibición concomitante de cMET y SRC indujo cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF y PHA6645752 en presencia o ausencia de DST analizados por WB. PHA665752, 100, 500 y 1500 nM durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; DST, 150 nM durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína.

A nivel de SRC, se observó que el tratamiento con DST inhibía la señalización de la tirosina 418. El tratamiento con anti-MET no modificó en la fosforilación de SRC Y418. La

combinación de ambos reducía la inhibición de SRC observada con DST en la tirosina 418, aunque el ajuste por el control de tubulina no lo permite afirmar taxativamente (Figura 54).

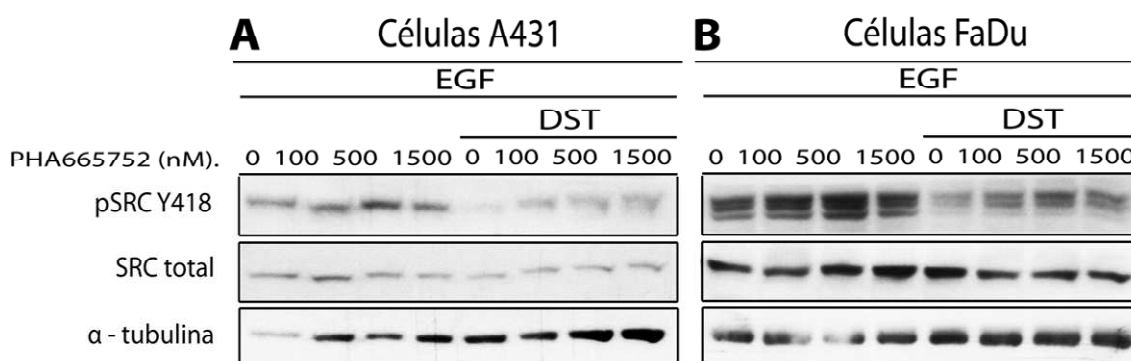


Figura 54. La inhibición concomitante de cMET y SRC indujo cambios en la regulación de SRC. Igual que la Figura 53 pero para las proteínas indicadas.

Respecto a ERK y AKT se observó que el tratamiento con DST inducía la fosforilación de AKT y ERK1/2. La administración del anti-MET al DST indujo aún más los niveles de ambas proteínas (Figura 55).

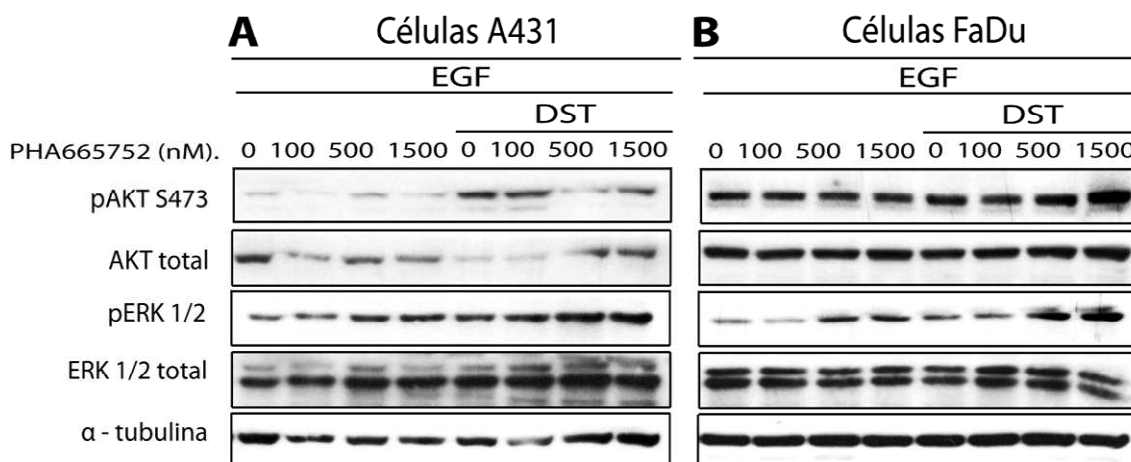


Figura 55. La inhibición concomitante de cMET y SRC indujo cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 53 pero para las proteínas indicadas.

En cuanto a STAT3, en las células A431 los niveles de la pY705 se vieron incrementados con DST en combinación con el anti-MET. Por el contrario, los niveles de la pS727 disminuyeron con DST en combinación con el anti-MET, excepto con la dosis más elevada de anti-MET donde los niveles aumentaron hasta los del valor basal (Figura 56A), aunque el ajuste por el control de tubulina no permite afirmarlo taxativamente. En las células FaDu, se observó un aumento de los niveles de la tirosina 705 y de la serina 727 con DST, que fueron aún más elevados cuando se combinó DST con el anti-MET (Figura 56B).

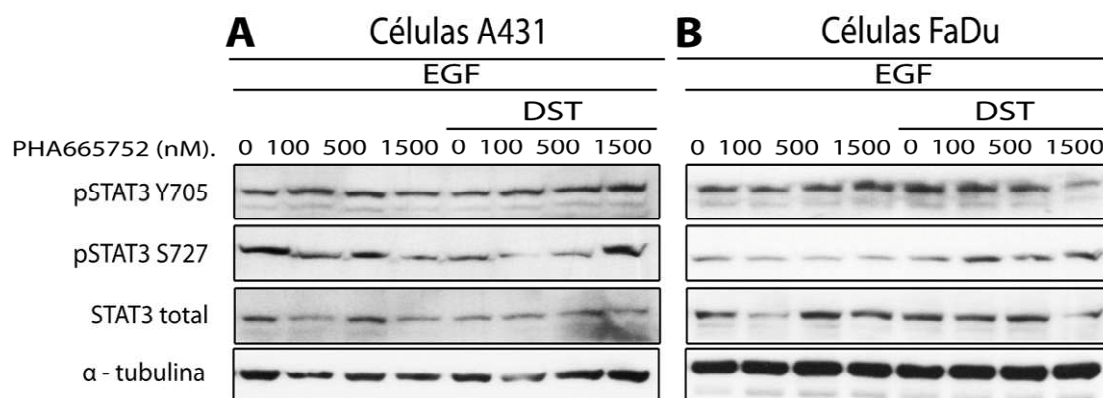


Figura 56. La inhibición concomitante de cMET y SRC indujo cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 53 pero para las proteínas indicadas.

3.1.10.2. La administración del inhibidor de cMET no revierte el efecto paradójico del PP2.

Decidimos también evaluar si los efectos de la combinación de DST y PHA6645752 eran comparables a los obtenidos usando el inhibidor específico de SRC, PP2. El efecto antagónico inducido por DST sobre la fosforilación de ERK1/2 y AKT se reprodujo con PP2 tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de cMET (Figuras 96-99, Anexo 2, página 187).

3.1.11. Efecto del dasatinib en combinación con un inhibidor de HER2.

La dimerización entre moléculas de la familia del EGFR es esencial en la activación de este receptor. En algunos casos, ésta puede tener lugar entre EGFR (HER1) y HER2. El receptor HER2 tiene una gran afinidad para heterodimerizar con EGFR (Mass, 2004; Normanno *et al.*, 2006). De modo que, decidimos determinar si DST podría favorecer la heterodimerización entre EGFR y HER2/Neu e inducir una mayor actividad del EGFR y, consecuentemente, de la señalización *downstream*. Para testar esta hipótesis usamos un inhibidor de HER2, AG825, en células A431.

3.1.11.1. La administración del inhibidor de HER2 no revierte el efecto paradójico producido por el DST.

Para establecer el efecto de la inhibición concomitante de SRC y HER2, se trataron células A431 con dosis crecientes del inhibidor AG825 (0'3, 3, 15 y 30 μ M x 2 h) y EGF (10 ng/mL x 10 min.) en presencia o ausencia del DST (150 nM x 48 h).

La administración de AG825 solo o en combinación con DST no produjo ningún cambio significativo en los niveles de la tirosina pY845 ni en los del EGFR total. A nivel de AKT, AG825 no frenó la activación de la serina pS473 tras EGF sino al contrario, incluso aumentó, y además,

este aumento aún fue mayor cuando se combinó AG825 con DST. En la proteína ERK1/2 la administración del AG825 no inhibió el efecto antagónico inducido por DST (Figura 57).

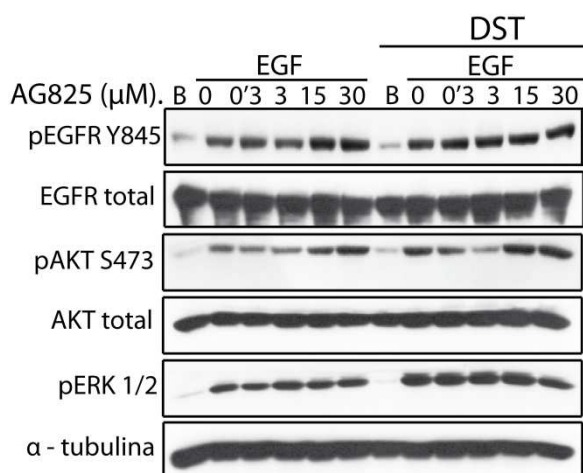


Figura 57. La inhibición de HER2 y SRC concomitante indujo cambios en las vías de señalización. Lisados de células A431 tratadas con EGF y AG825 en presencia o ausencia de DST analizados por WB. B, vehículo; AG825, 0, 3, 15 y 30 μM durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; DST, 150 nM durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado.

3.1.11.2. La administración del inhibidor de HER2 revierte el efecto paradójico del DST cuando se combina con C225 en células A431.

Para establecer el efecto de la inhibición concomitante de SRC, EGFR y HER2, se trataron células A431 con dosis crecientes del inhibidor AG825 (3 y 30 μM x 2 h) y EGF (10 ng/mL x 10 min.) en presencia o ausencia del C225 (30 nM x 48 h) y/o DST (150 nM x 48 h).

En primer lugar exploramos el receptor, donde la administración del inhibidor AG825 aumentó los niveles de la tirosina 845 cuando se combinó con EGF o C225+EGF, un efecto que podía intuirse también en la figura anterior. El tratamiento con DST redujo significativamente los niveles de la pY845 a pesar de que con la combinación de C225 y AG825 la inhibición no fue tan eficiente. El EGFR total presentó un patrón de señalización similar a la pY845 excepto con la máxima dosis de la triple combinación donde fue significativamente inhibido.

Para evaluar la actividad de SRC se determinó los niveles fosforilados de la tirosina 529 de SRC la cual fue inhibida DST a pesar de que como hemos observado con el EGFR, con la triple combinación la disminución no fue tan eficiente.

En la tirosina 705 de STAT3 se observó un incremento de fosforilación tras la administración de C225 y DST, fosforilación que resultó significativamente inhibida por AG825.

Por último evaluamos los cambios en pERK1/2, donde se observó que el efecto antagónico podía ser inhibido por AG825 sobre todo en combinación con C225 (Figura 58).

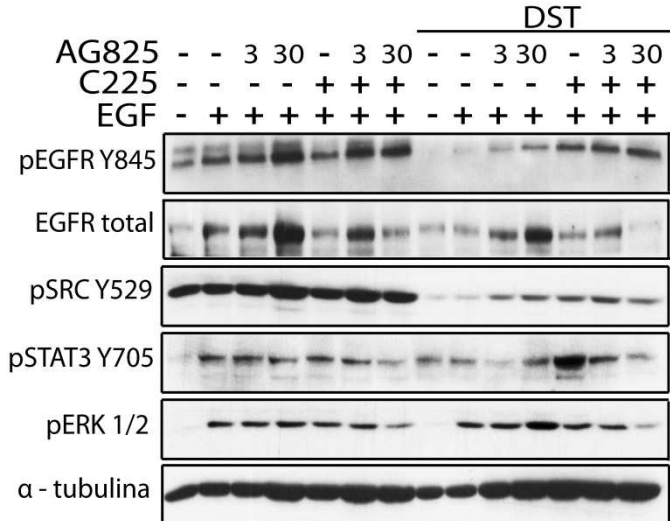
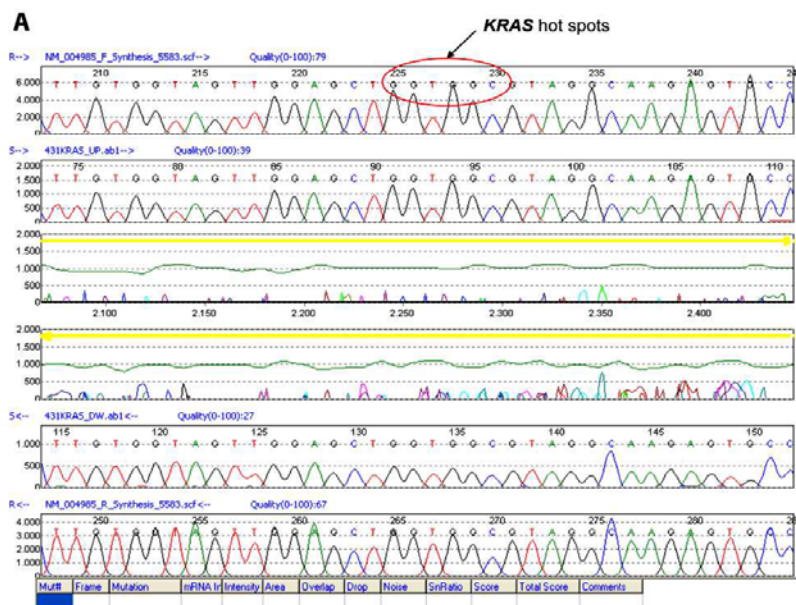


Figura 58. La inhibición concomitante de HER2, EGFR y SRC indujo cambios en las vías de señalización. Lisados de células A431 tratadas con EGF y AG825 en presencia o ausencia de C225 y/o DST analizados por WB. AG825, 3 y 30 μM durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; DST, 150 nM durante 48 h; C225, 30 nM durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado.

3.1.12. La inhibición de SRC incrementa la actividad de RAS en las células A431 y FaDu WT

Una vez identificado el efecto antagónico producido por DST, decidimos delimitar la posición en la vía de señalización del EGFR-ERK1/2 en la cual podría tener origen el estímulo que incrementaba los niveles de pERK y pAKT. Nuestra hipótesis inicial fue que la proteína RAS podría estar directamente implicada, puesto que tanto ERK como AKT dependen de RAS (Takai *et al.*, 2001).

Primero determinamos el estado mutacional de la proteína RAS en los codones más susceptibles de estar mutados, los codones 12 y 13, de ambas líneas celulares. El genotipo obtenido fue *wild-type* en ambas líneas celulares (Figura 59).



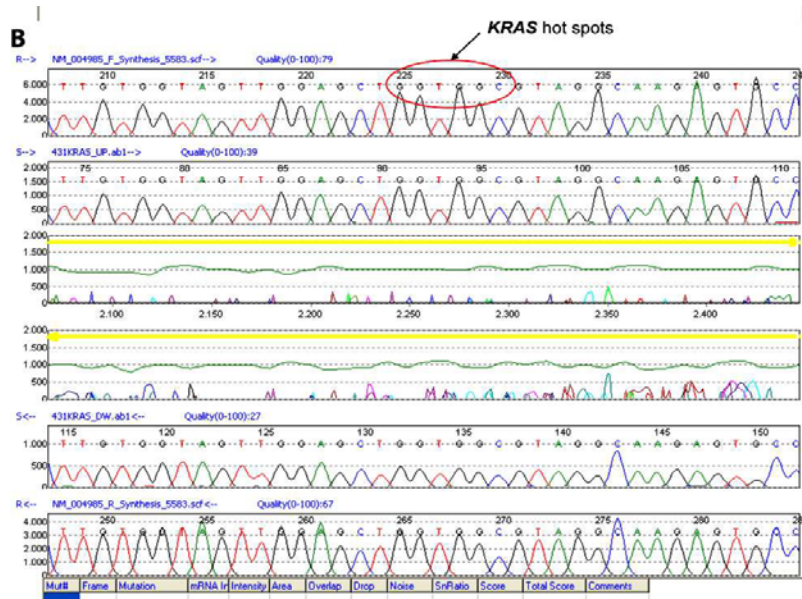


Figura 59. Hot spots wild type de la secuenciación de la proteínas RAS. ADN de células A431 (A) y FaDu (B) secuenciado para los codones 12 y 13 de *Ras*.

Una vez establecido el fenotipo de la proteína RAS para ambas líneas celulares, se decidió realizar un *pull-down* de la proteína para determinar su actividad en función de los tratamientos. Para ello, A431 y FaDu WT se trataron con EGF (10 ng/mL x 10 min.) y C225 (30 nM x 48 h) en ausencia o presencia de DST (150 nM x 48 h) (ver detalles en anexo 1, pagina 180).

En presencia de DST la estimulación con EGF causó un aumento en la actividad de RAS en ambas líneas celulares. Además, mientras el tratamiento con C225 disminuyó parcialmente los niveles de RAS-GTP (activo), la adición de DST indujo la actividad de RAS en vez de inhibirla (Figura 60).

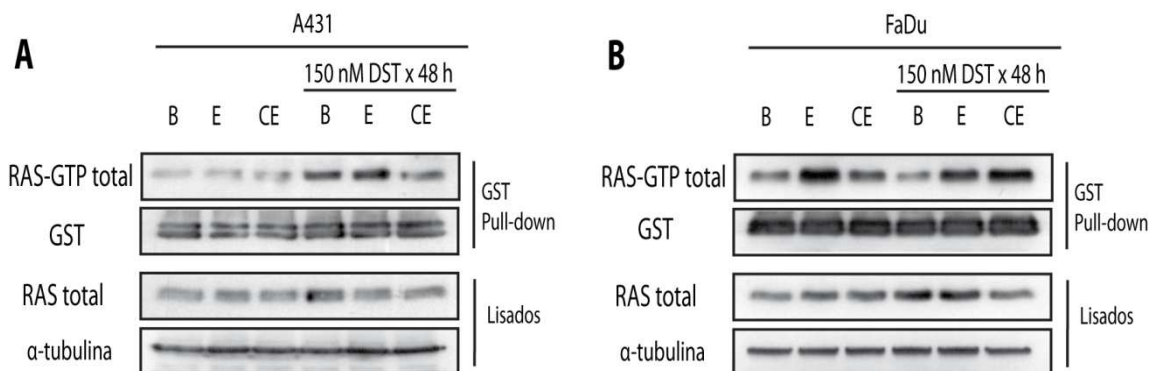


Figura 60. Efecto del DST en la actividad de la proteína RAS. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF, C225 en presencia o ausencia de DST analizados mediante la técnica de *pull-down*. Los niveles de GST se usaron como control de carga en los *pull-down* y, RAS total y α -tubulina se usaron

como control de carga de los lisados. B, vehículo; C, C225 30 nM durante 48 h; E, EGF 10 ng/mL durante 10 min.; DST, 150 nM durante 48 h. Se realizó 1 *pull-down* por línea celular.

3.2. Resultados obtenidos *in vivo*.

A continuación, examinamos si los cambios inducidos por el DST en los niveles de algunas proteínas de las vías de señalización observados *in vitro* se observaban en los xenoinplantos procedentes de ratones atímicos.

3.2.1. Efecto *in vivo* del DST en las vías de señalización.

Para establecer los cambios en la señalización se obtuvieron muestras, procedentes de tumores A431 y FaDu tratados durante 3 días con RXT+C225 y RXT+C225+DST (ver detalles en Figura 80), a las cuales se les realizó una extracción proteica y se les examinó las mismas proteínas observadas *in vitro*.

3.2.1.1. El EGFR responde al DST de modo distinto en los tumores A431 y FaDu.

En primer lugar se examinó la respuesta del EGFR. En los tumores derivados de células A431, se observó que los niveles de la tirosina pY845 y pY1068 eran mayores en el grupo de animales tratados con DST (Figura 61A). En los tumores derivados de células FaDu se observó una reducción de los niveles de la pY845 (Figura 61B).

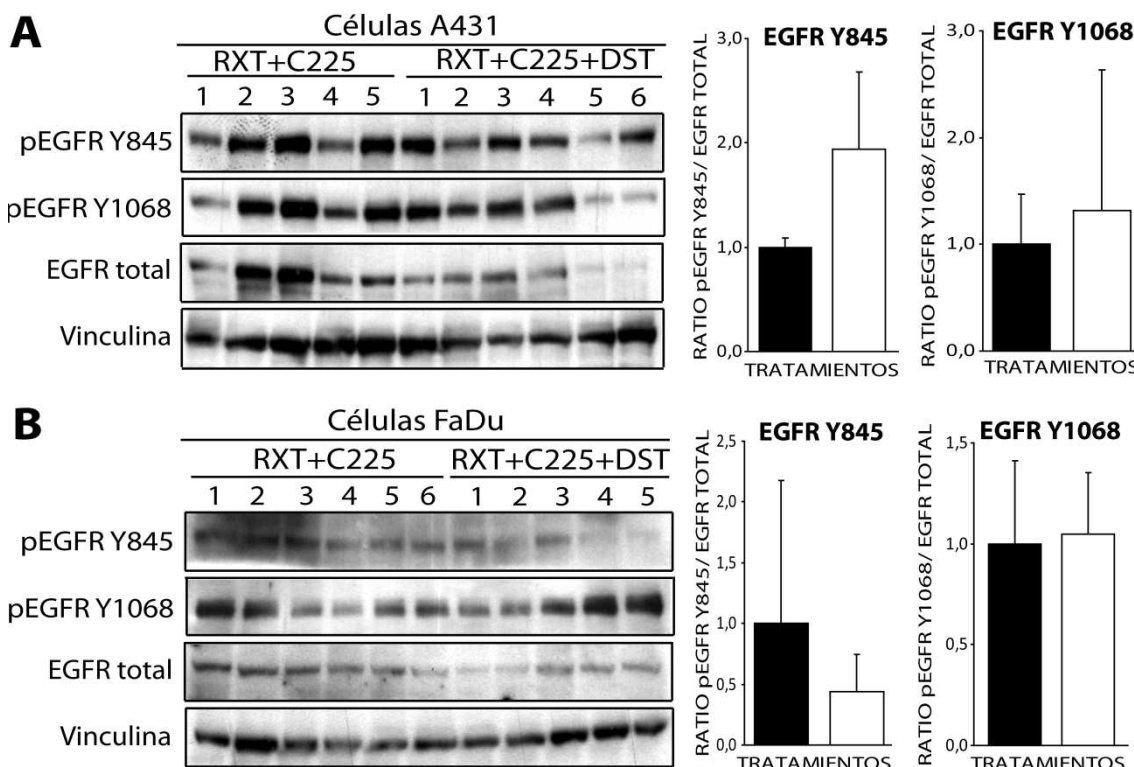


Figura 61. Efecto *in vivo* del DST en el EGFR. Lisados procedentes de tumores A431 (A) y FaDu (B) tratados con RXT+C225 (en negro) o RXT+C225+DST (en blanco) analizados por WB. Los tumores se numeraron y se agruparon según el tratamiento recibido. Los niveles de cada proteína fueron cuantificados (densidad óptica) y normalizados por la vinculina. La ratio de la actividad de las proteínas se obtuvo de la ratio normalizada de la proteína fosforilada respecto la ratio normalizada de la proteína total. Se obtuvieron las muestras siguiendo el esquema de la Figura 80. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (*Mann-Whitney test*).

3.2.1.2. *El DST inhibió significativamente la actividad de SRC en los tumores de ambas líneas celulares.*

A continuación se examinó la respuesta de SRC según los tratamientos. En los tumores derivados de ambas líneas celulares, se observó una clara inhibición de la fosforilación de las tirosinas responsables de la regulación de SRC, Y418 (A431, $p = 0'017$; y FaDu, $p = 0'017$) y Y529 (Figura 62).

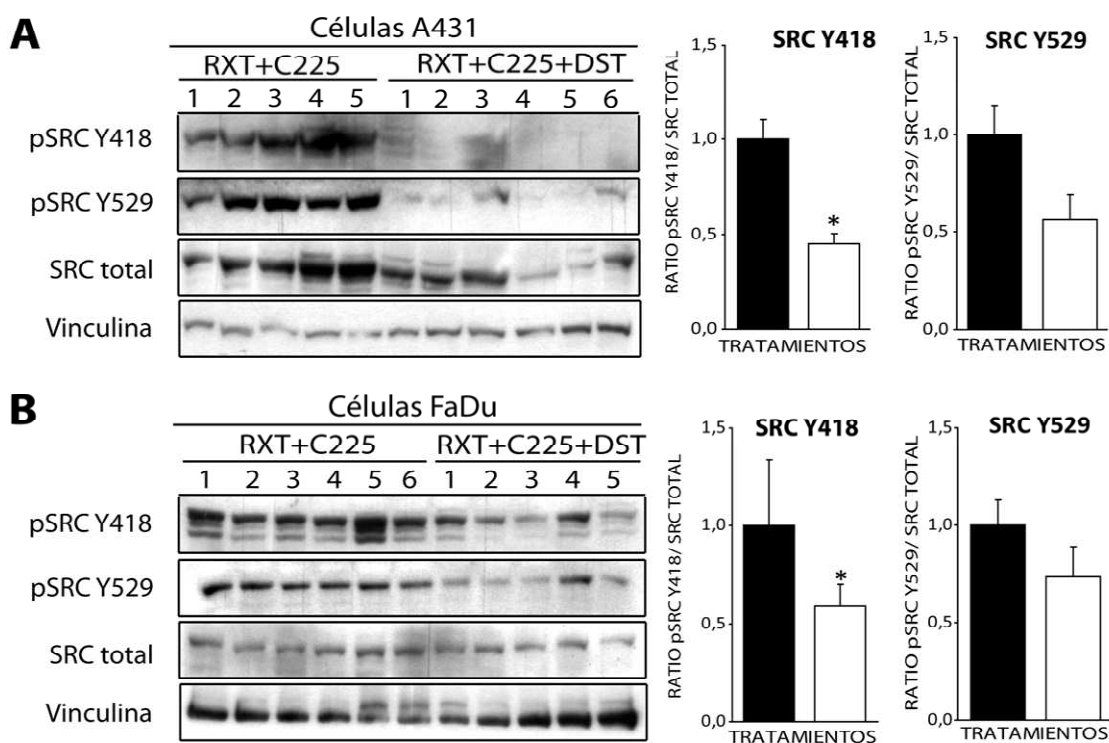


Figura 62. Efecto *in vivo* del DST en SRC. Igual que la Figura 61 pero para las proteínas indicadas. * $p < 0'05$ comparado con los valores con RXT+C225 (*Mann-Whitney test*)

3.2.1.3. *El DST induce la actividad de STAT3 en los tumores de ambas líneas celulares.*

Se determinó la respuesta de STAT3 al añadir DST. En los tumores A431, se observó la inducción de la pY705 y de la pS727 ($p = 0'006$) (Figura 63A). En los tumores FaDu, también se observó que la administración de DST indujo un incremento de los niveles de pY705 ($p = 0'011$) y de la serina 727 (Figura 63B).

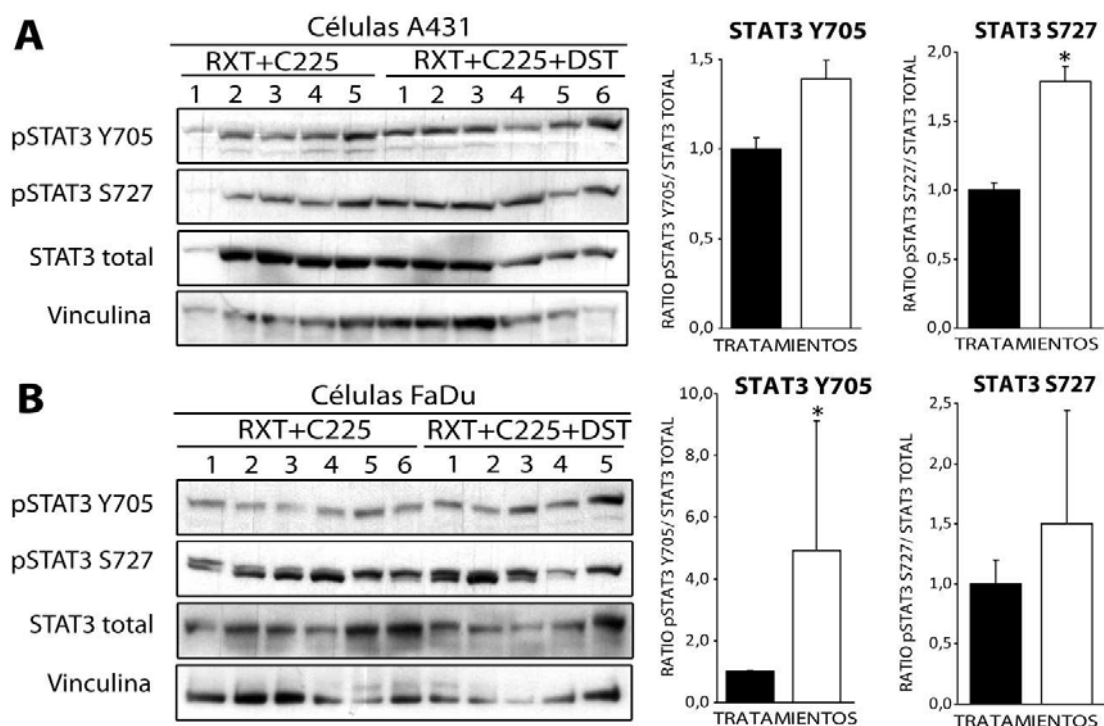


Figura 63. Efecto *in vivo* del DST en STAT3. Igual que la Figura 61 pero para las proteínas indicadas. * $p < 0'05$ comparado con los valores con RXT+C225 (*Mann-Whitney test*).

3.2.1.4. El DST indujo la pERK1/2, pero AKT respondió de modo distinto en los tumores A431 y FaDu WT.

En los tumores A431, se observó que los animales tratados con DST presentaban una disminución de los niveles de la pS473 del AKT y un incremento de los niveles de pERK1/2 (Figura 64A). En los tumores FaDu, se observó un fuerte aumento de los niveles de la pS473 del AKT ($p = 0'030$) y un incremento moderado de los niveles de pERK1/2 (Figura 64B).

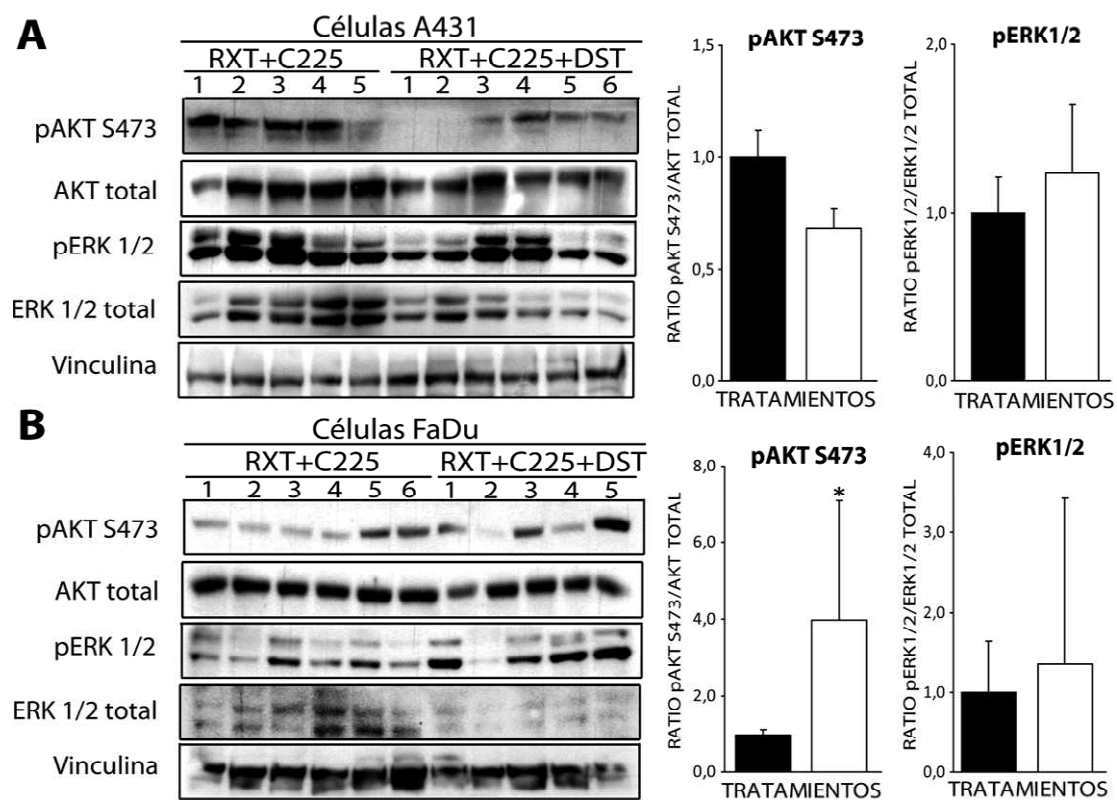


Figura 64. Efecto *in vivo* del DST en ERK1/2 y AKT. Igual que la Figura 61 pero para las proteínas indicadas. * $p < 0.05$ comparado con los valores con RXT+C225 (*Mann-Whitney test*).

4. CAMBIOS EN LA ANGIOGÉNESIS ASOCIADA A TUMOR INDUCIDOS POR LOS TRATAMIENTOS

4.1. Exploración del efecto del dasatinib en la secreción de VEGF.

El mayor crecimiento de los tumores tratados con DST nos llevó a comprobar si la secreción de uno de los principales factores proangiogénicos, VEGF, se inducía por DST. Se trataron células A431 y FaDu con radiación, radiación más cetuximab o la triple combinación y se recogió el sobrenadante de los cultivos a 0, 24 y 48 h, momento en que se determinaron los niveles de VEGF mediante ELISA (ver detalles en anexo 1, página 180).

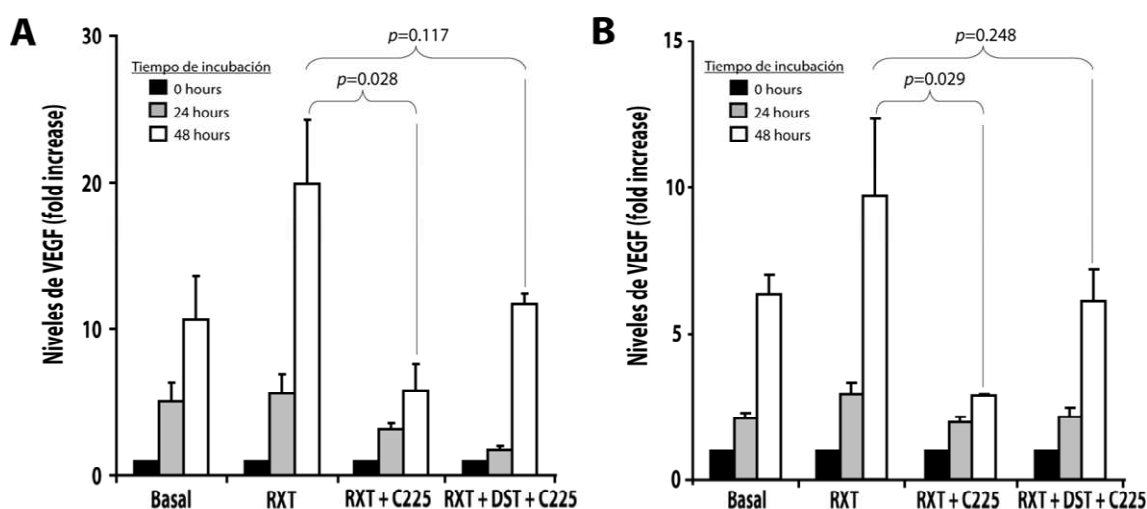


Figura 65. Efecto paradójico del DST en la secreción de VEGF después de radioterapia y C225. Células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con radioterapia, radioterapia y C225 o la triple combinación. A las 0, 24 y 48 h, se obtuvieron los sobrenadantes y se realizó el recuento celular de los cultivos. El valor VEGF se determinó mediante un ensayo ELISA y se normalizó por el número total de células. Las variaciones se describieron como incrementos relativos al tiempo 0 h. RXT, 8 Gy; DST, 150 nM; C225, 30 nM. Las columnas indican los promedios y las barras el SE. Se indican los valores de p (Mann-Whitney test). Se realizaron 3 experimentos para A431 y 2 para FaDu, cada uno por duplicado.

Tras la irradiación, se observó un incremento de los niveles de VEGF dependiente del tiempo (Figura 65). Además, se observó que a 48 h el C225 era capaz de inhibir en un factor de 3/4 la secreción de VEGF inducida por la radiación. Sin embargo, la administración de DST aumentó significativamente los niveles de VEGF a pesar del C225: en ambas líneas celulares, a 48 h, el DST revertió el efecto producido por el C225 en un factor de 2 (Figura 65).

4.2. Exploración del efecto del dasatinib en la angiogénesis asociada a tumor.

El incremento en la secreción de VEGF así como el hecho de que la progresión tumoral está asociada a la neoangiogénesis, nos llevó a investigar si el incremento del volumen tumoral

observado en los tumores tratados con DST estaba relacionado con un incremento en la densidad vascular (MVD). Para ello, se obtuvieron muestras de tumores A431 y FaDu WT tratados durante 3 días con RXT+C225 y RXT+C225+DST, a las cuales se les determinó el marcador de angiogénesis CD31/PECAM-1.

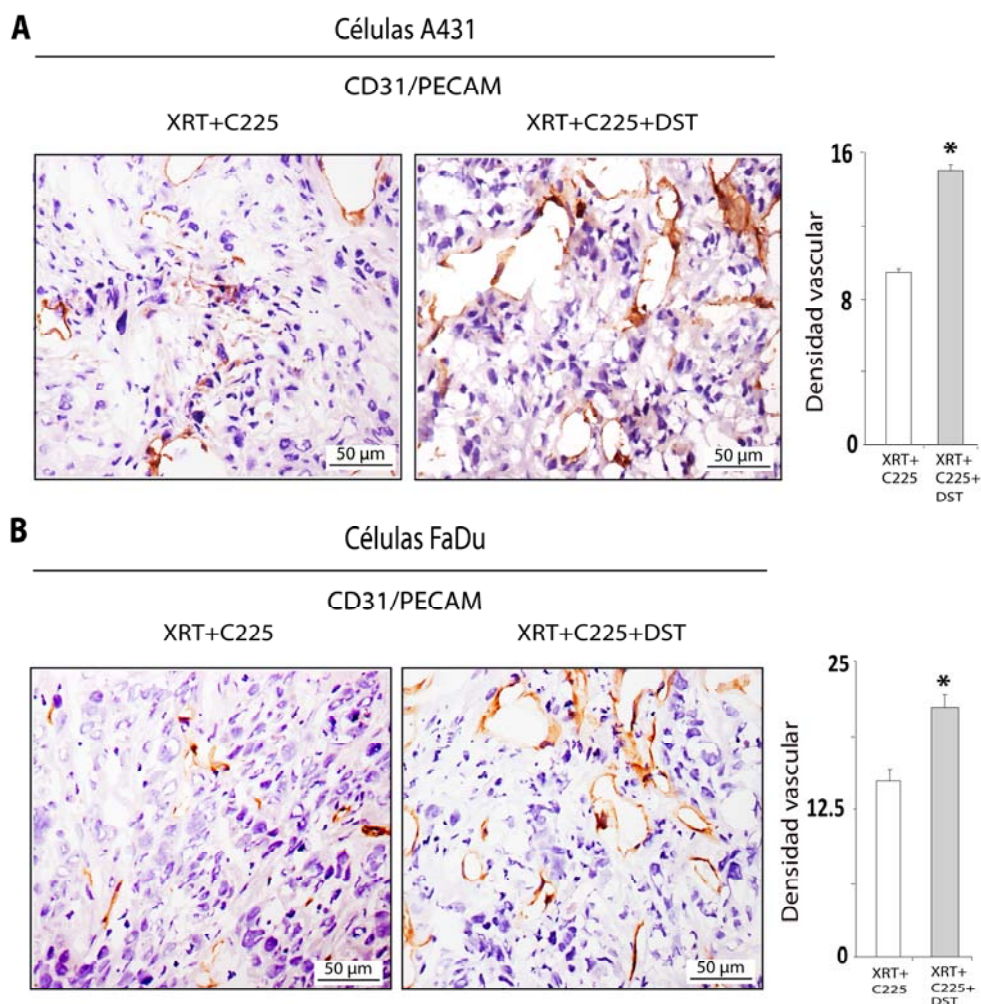


Figura 66. Efecto paradójico del DST en la angiogénesis asociada a tumor. Tumores A431 (A) y FaDu (B) tratados según la Figura 80. Se muestran imágenes representativas de una inmunohistoquímica convencional para el antígeno CD31/PECAM en cortes de OCT. Se determinó la MVD usando 5 tumores independientes y 5 campos por tumor, siguiendo el criterio de *Weidner et al.* (*Weidner et al.*, 1991) Se realizaron dos recuentos independientes. Las columnas son promedios y las barras son SE. * $p < 0.05$ respecto los valores sin DST.

Se observó un aumento de positividad para CD31/PECAM en los tumores tratados con DST. El mayor incremento de MVD inducido por DST se observó en los tumores FaDu (15 versus 21; $p = 0.003$) (Figura 66B). En los tumores A431, la MVD también era más elevada en los tumores tratados con DST (9 versus 14; $p = 0.001$) (Figura 66A), indicando que DST estaba involucrado en una mayor angiogénesis asociada a tumor.

5. CAMBIOS INDUCIDOS EN LA SÍNTESIS DE ADN POR LOS TRATAMIENTOS

5.1. Exploración del efecto del dasatinib en la síntesis del ADN.

El crecimiento de los tumores tratados con DST también podría estar asociado con un incremento de la proliferación. De modo que, se decidió determinar el índice de BrdU incorporada, marcador de la síntesis de ADN.

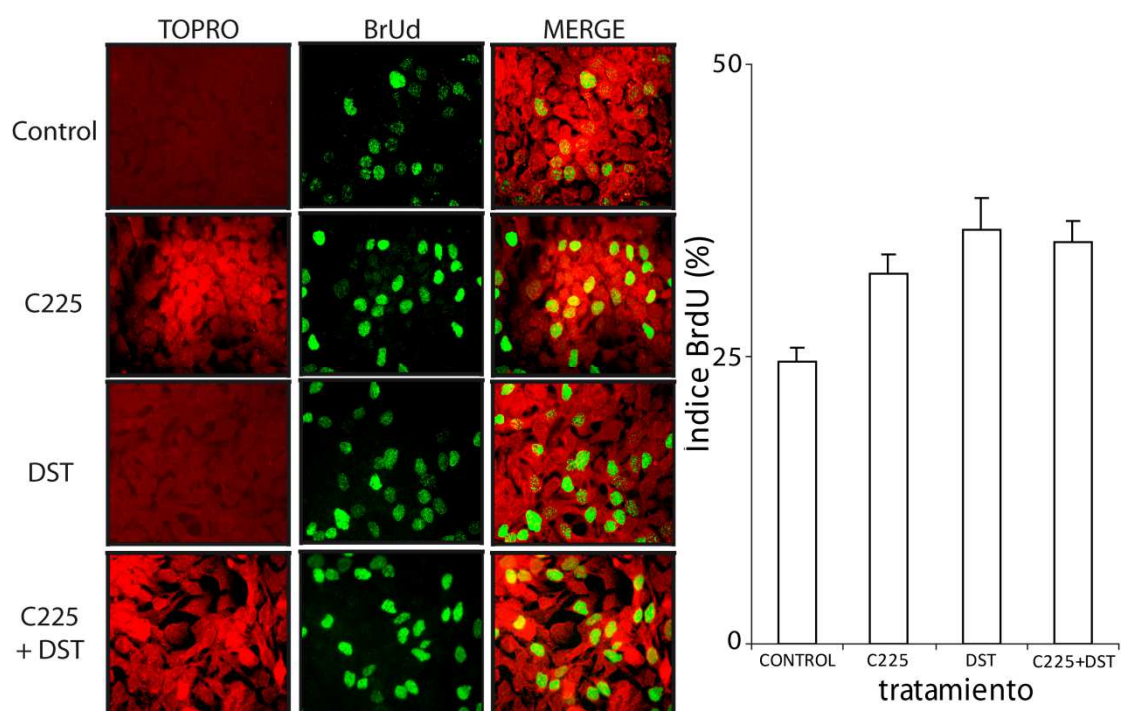


Figura 67. Efecto *in vitro* de los tratamientos en la síntesis del ADN. Células A431 sembradas sobre cubreobjetos fueron tratadas con C225, DST o la combinación de ambos durante 48 h (ver detalles en anexo 1 pagina 177). Después del tratamiento, se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia para detectar BrdU (en verde) y los núcleos celulares (en rojo). Se calculó el índice de núcleos positivos para BrdU. DST, 150 nM; C225, 30 nM. Se realizaron 4 experimentos independientes con un recuento de 5 campos por experimento. * $p < 0.05$ respecto el control.

Si bien el tratamiento con DST dio lugar a valores más elevados de núcleos BrdU positivos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 67).

5.2. Exploración del efecto del dasatinib en la síntesis del ADN.

Se evaluó el índice de BrdU incorporada, en los tumores A431 y FaDu tratados 3 días con RXT+C225 o RXT+C225+DST.

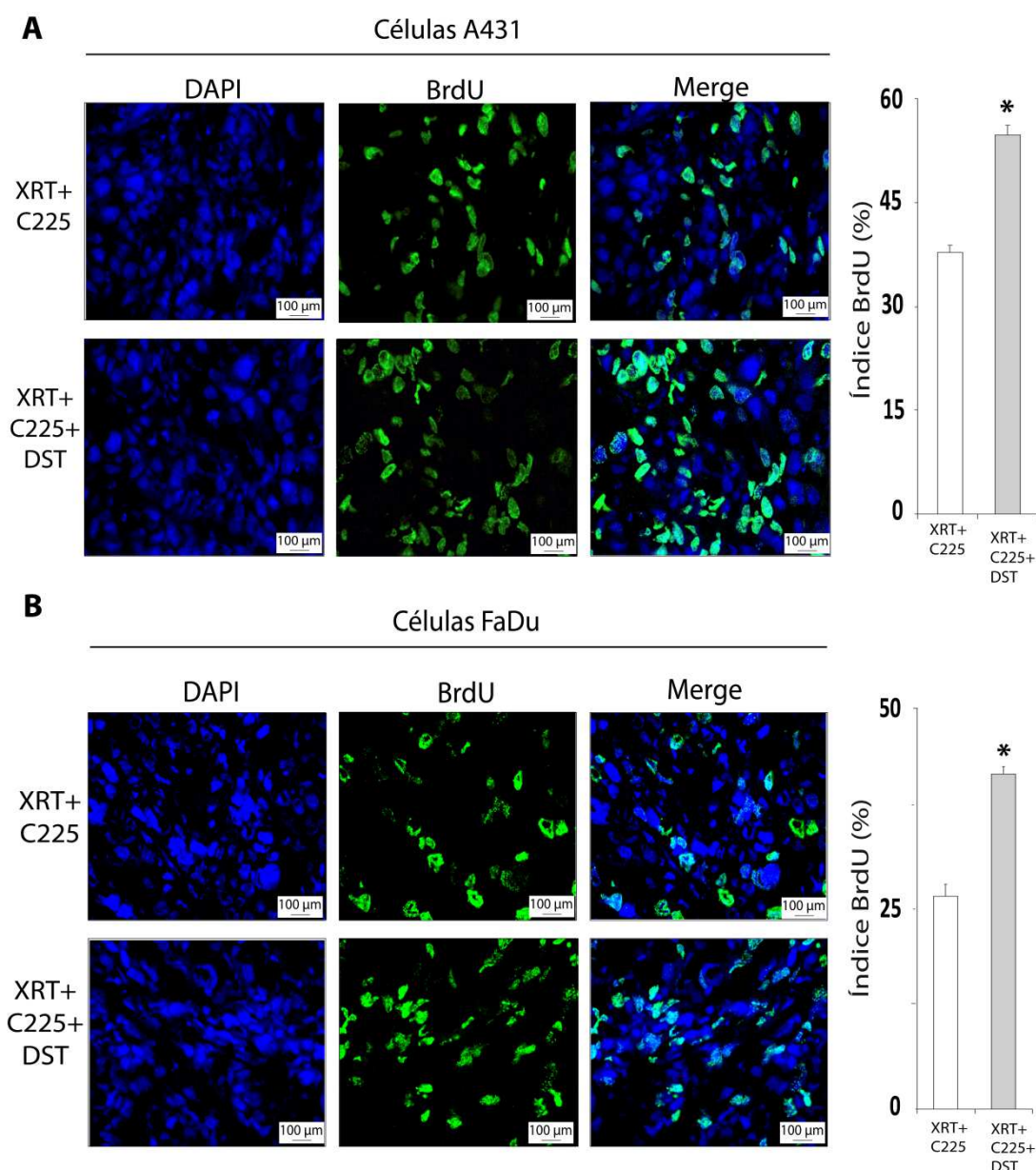


Figura 68. Efecto paradójico del DST en la síntesis de ADN. Tumores A431 (A) y FaDu (B) WT tratados según el esquema representado en la Figura 80. Imágenes representativas de una inmunofluorescencia de BrdU incorporada en cortes de OCT. El índice de BrdU se calculó como la ratio entre la fluorescencia verde (BrdU incorporada) y la fluorescencia azul de los núcleos (DAPI) usando 5 tumores independientes y 5 campos por tumor. Las columnas son promedios y la barras son SE. * $p < 0'05$ respecto los valores sin DST.

Se observó que el número de células positivas para la BrdU era mayor en los tumores procedentes de ratones tratados con DST. En los tumores FaDu, se observó que mientras la ratio BrdU/núcleos era de un 26 % en los tumores que recibieron radioterapia y cetuximab, la ratio era de un 42 % para los tratados con la triple combinación ($p = 0'0001$) (Figura 68B). En los tumores A431, la administración de DST también indujo un incremento en la BrdU incorporada de 38 % a un 55 % ($p = 0'0001$) (Figura 68A).

6. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL DASATINIB EN EL PROTEOMA

El estudio del proteoma permite evaluar los cambios que sufre el conjunto de proteínas celulares tras un tratamiento, por lo que sirve de herramienta para explorar mecanismos de acción.

Para identificar mecanismos implicados en el efecto paradójico inducido por DST, se usaron tumores derivados de células FaDu-WT tratados durante 3 días con RXT+C225 o RXT+C225+DST (n = 10 por tratamiento) según el esquema de la Figura 80. Los tumores fueron homogeneizados, marcados con distintos fluorocromos en función del tratamiento recibido y sometidos a una electroforesis de dos dimensiones (2D-DIGE). Se detectaron 96 proteínas (spots) que se expresaban al alza o a la baja en el grupo de RXT+C225+DST en relación al grupo control (de tratamiento con RXT+C225) (Figura 69). Se seleccionaron 32 spots para la espectrometría de masas (los restantes no se pudieron identificar debido a la baja abundancia, a una rápida degradación proteica o por la baja sensibilidad del MALDI-TOF/TOF).

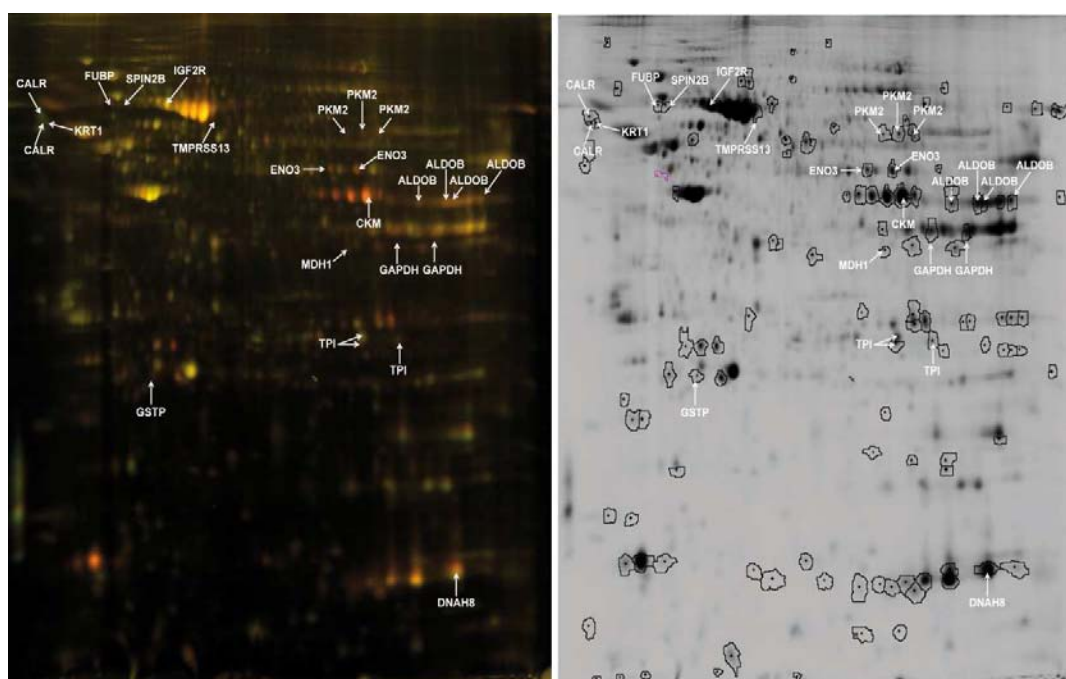


Figura 69. Spots de las proteínas detectadas mediante la electroforesis 2D-DIGE. Los extractos proteicos de cada muestra se marcaron con Cy3 y con Cy5 (marcaje cruzado entre los dos grupos de tratamiento) y fueron sometidos a un enfoque isoelectrónico con un marcaje Cy2 como control interno. Para la segunda dimensión, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida de 12,5 %. Los círculos muestran los spots detectados y las flechas indican algunas de las proteínas reguladas de forma distinta en el grupo de RXT+C225+DST respecto RXT+C225 con número de accesoión (base de datos SWISS-Prot).

De estas 32 proteínas expresadas de forma distinta, 16 proteínas fueron de origen humano (relacionadas con el tumor) y las otras 16 de origen murino (relacionadas con el

estroma). En ambos casos, la mayoría de las proteínas reguladas al alza pertenecen al metabolismo glucolítico. En cuanto a las proteínas reguladas a la baja tan sólo se observaron dos proteínas la *calreticulina* (se encontró en ambas especies) y la *queratina de tipo II* (sólo se observó en las proteínas de origen humano). Las proteínas identificadas en los spots seleccionados, así como las diferencias (ratio) en la expresión proteica en el grupo de RXT+C225+DST respecto el grupo de RXT+C225, la función molecular y el proceso biológico en el que están involucradas, se encuentran resumidas en la Tabla 16 y 17.

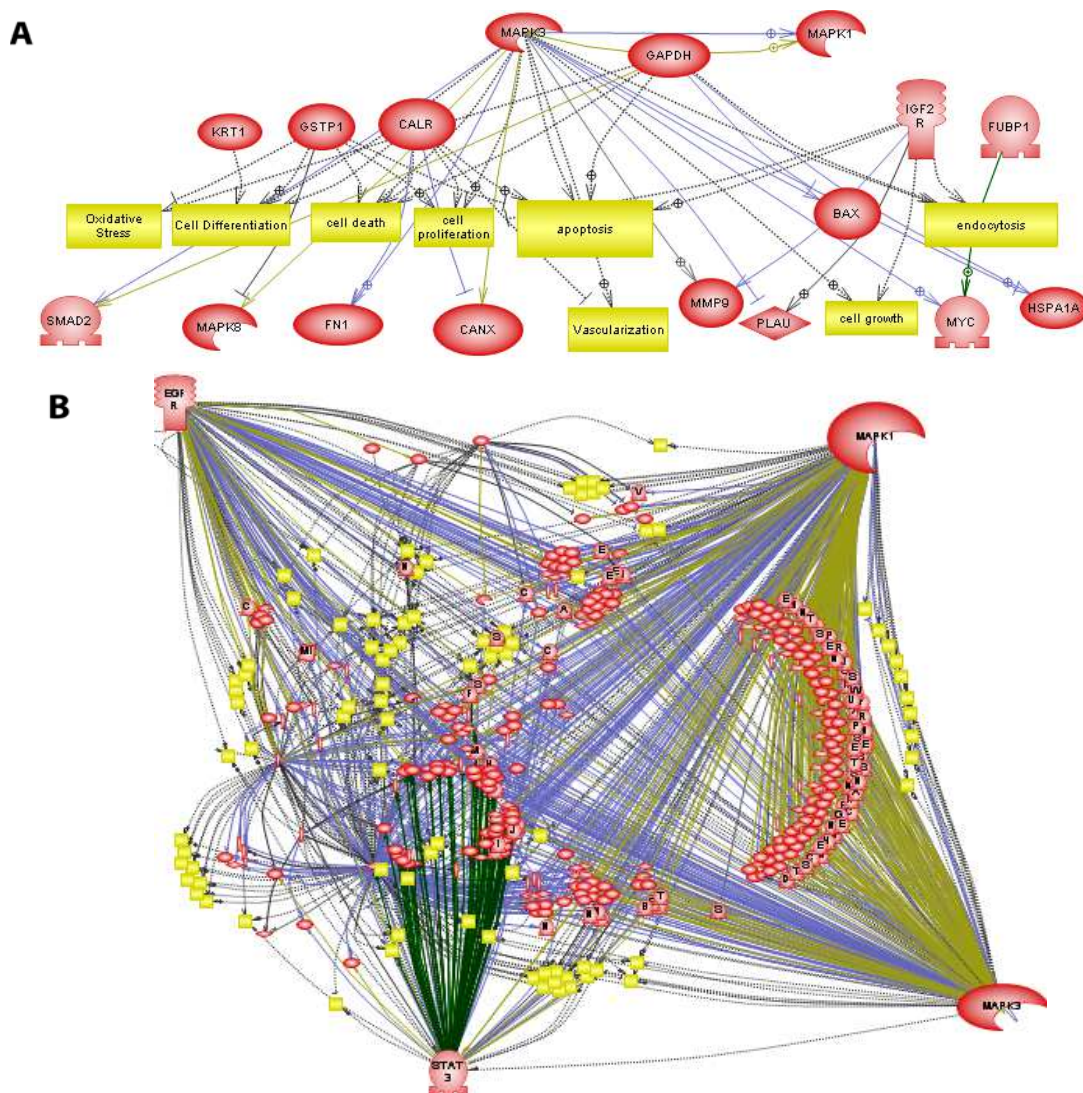


Figura 70. Dianas comunes y procesos activados en las muestras tratadas con DST. Representación visual de las redes moleculares del 2D-DIGE, de las proteínas identificadas y de los procesos celulares implicados realizado con el programa *Pathway Studio 8.0* basado en referencias de *PubMed*.

Un análisis funcional de las proteínas humanas mediante el programa *Pathway Studio 8.0* puso de manifiesto dianas y procesos activados que tenían en común estas proteínas. Un análisis preliminar mostró su participación en procesos de estrés oxidativo, diferenciación

celular, muerte celular, proliferación, apoptosis, vascularización, crecimiento celular y endocitosis. Además, algunas de estas proteínas estaban estrechamente relacionadas con MAPK1 (ERK2) y MAPK3 (ERK1) (Figura 70A). Un segundo análisis que incluyó las proteínas EGFR, ERK1, ERK2 y STAT3, que se habían visto implicadas en el efecto antagónico inducido por DST (en western blots), predijo un elevado número de interacciones con las proteínas humanas identificadas por MALDI-TOF/TOF (Figura 70B y Tablas 16-17).

6.1. Efecto del DST en la Lactato deshidrogenasa (LDH).

Una de las proteínas que se encontraron reguladas al alza y que es un índice de proliferación en algunos cánceres es la LDH. Se evaluaron los niveles de LDH en sobrenadantes de cultivos celulares de A431 o FaDu WT tratados con C225 en ausencia o presencia de DST (ver detalles en el anexo 1 pagina 181).

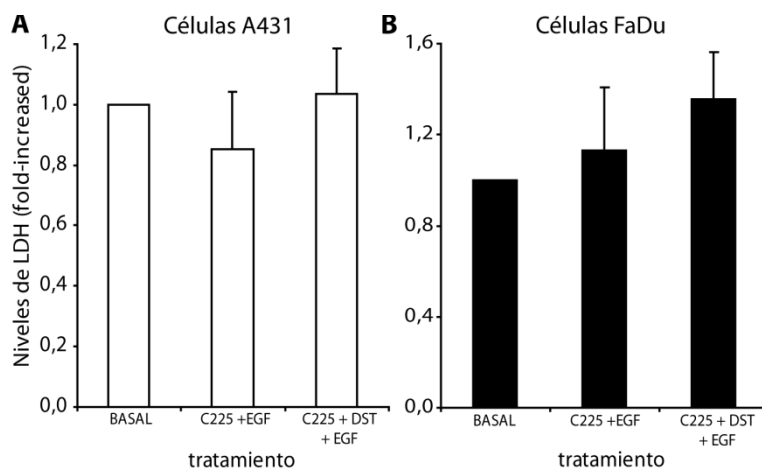


Figura 71. Efecto del DST en la secreción de LDH. Células A431 (A) y FaDu (B) WT tratadas con C225 en ausencia o presencia de DST. Se recogieron los sobrenadante a las 48 h y la LDH se determinó mediante espectrometría molecular de absorción. Las variaciones de LDH tras los tratamientos se normalizaron por su valor basal. DST, 150 nM durante 48 h; C225, 30 nM durante 48 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min. Se realizaron 2 experimentos para cada línea. Las columnas indican promedios y las barras son SE.

En ambas líneas celulares, se pudo observar un leve incremento de los niveles de LDH cuando añadíamos el DST (Figura 71).

6.2. Las proteínas evaluadas en los tumores A431 y FaDu WT confirman los resultados obtenidos en proteómica.

Se examinaron por Western blot proteínas relacionadas con el metabolismo glucolítico, hipoxia y angiogénesis que coincidían con muchas de las funciones de las proteínas obtenidas con el estudio de proteómica. Además, también se escogieron por su interacción

con las vías MAPK y PI3K/Akt, las cuales hemos descrito asociadas al efecto antagónico inducido por DST. En los tumores A431 se observó que la administración de DST no modificaba los niveles de la proteína HIF1 α , pero sí disminuía los niveles de Glut1 e inducía los niveles de p-p70 S6K ($p = 0'029$) (Figura 72A). Por el contrario, en los tumores FaDu-WT se observó un incremento de los niveles de HIF1 α , Glut1 y p-p70 S6K ($p = 0'030$) (Figura 72B). No se observó ninguna modificación de los niveles de la proteína c-MYC.

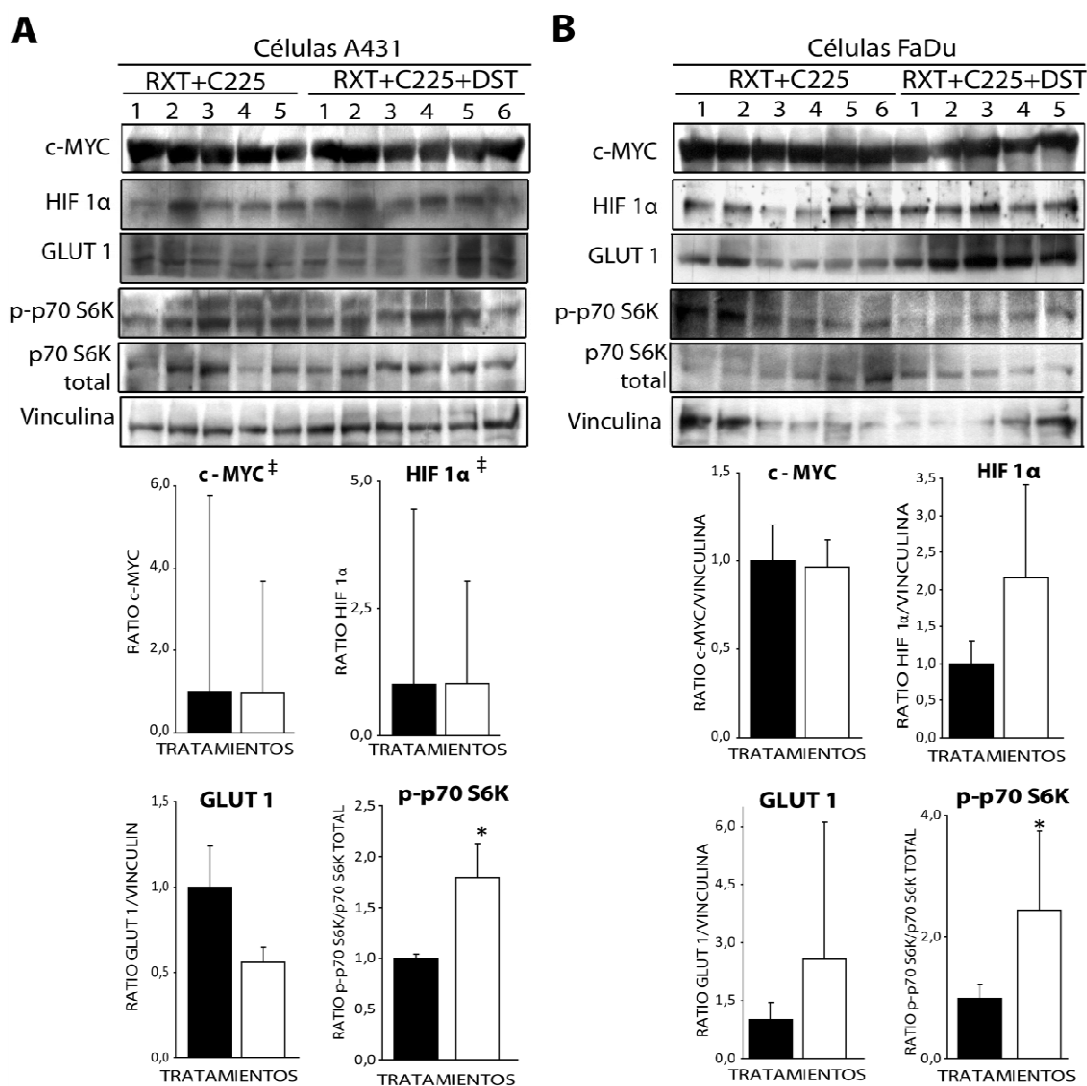


Figura 72. Efecto *in vivo* del DST en proteínas asociadas a los resultados de proteómica. Lisados procedentes de tumores A431-WT (A) y FaDu-WT (B) tratados según Figura 80 con RXT+C225 (en negro) o RXT+C225+DST (en blanco) analizados por WB. Los tumores se numeraron y se agruparon según el tratamiento recibido. Los niveles de cada proteína fueron cuantificados (densidad óptica) y normalizados por la vinculina. Los valores de p-p70S6K proceden del cociente entre la ratio normalizada de la proteína fosforilada respecto la ratio normalizada de la proteína total. RXT, 9 Gy (fracciones diarias de 3Gy); DST, dosis diaria de 50 mg/Kg/día por 3 días; C225, 1 dosis de 1 mg y 1 dosis de 0'5 mg. * $p < 0'05$ comparado con los valores con RXT+C225 (*Mann-Whitney test*). ‡ No se pudo normalizar por la vinculina porque no se realizó.

Tablas 16 y 17. Expresión diferencial del proteoma (en tumores derivados de células FaDu). La ratio expresa el número de veces que una proteína se encuentra regulada al alza o a la baja (-) tras la terapia RT+C225+DST en relación con la de RT+C225. Las proteínas en negrita son proteínas que podrían participar o tener un papel interesante en el efecto antagonista observado con el DST. Mientras que las proteínas marcadas en gris son proteínas que fueron identificadas pero el intervalo de confianza (C.I. %) no era significativo. A continuación de la ratio se muestra la función molecular y el proceso biológico en el que se encuentran implicadas las proteínas indicadas.

Tabla 16. PROTEÍNAS HUMANAS				
Núm. spot	Nombre proteínas	Ratio	Función molecular	Proceso biológico
8	Proteína 1 de unión al elemento <i>upstream Far</i>	1,51	Regula la expresión de Myc Activador y represor de la transcripción Helicasa dependiente de ATP	Transcripción del promotor ARN polimerasa II Regulación de la transcripción
9	<i>Spindlin-2B</i>	1,72	Progresión del ciclo celular e inhibición de la apoptosis después de remover los factores de crecimiento esenciales.	Apoptosis Ciclo celular
13	Serín-proteasa transmembrana 13	1,7	Hidrolasa, proteasa, serina proteasa Actividad de receptor <i>scavenger</i> o "escoba"	Proteólisis
16	Receptor catión independiente de la manosa 6-fosfato	1,7	Unión de receptores, glicoproteínas y fosfoproteínas. Actividad de receptor del factor de crecimiento insulínico. Actividad de transporte	Endocitosis mediada por receptores Transporte
18	Calreticulina	-1,56	Se une a proteínas mal plegadas y previene su transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Chaperona	Arresto del ciclo celular. Regulación negativa de la transcripción y la translación, y regulación positiva de la replicación del ADN. Inhibe el crecimiento celular, la neovascularización e incrementa la inmunogenicidad.
20	Calreticulina= Proteína de unión del calcio	-1,51		
19	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,78	La regeneración energética por PKM permite la supervivencia de las células bajo condiciones de hipoxia. Actividad piruvato quinasa. Regula la proliferación y la supervivencia de las células tumorales. Unión de las quinasa transferasa, ATP y proteínas	Glicólisis Muerte celular programada
23	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,85		
25	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,71		
21	Queratina, tipo II citoesquelética 1	-1,51	Regula la actividad quinasa de la PKC y de SRC vía ITB1 y RACK1 Actividad de receptor. Unión de proteínas y azúcares. Constitutivo estructural del citoesqueleto	Activación del complemento, vía de señalización de las lectinas Regulación de la angiogénesis Respuesta al estrés oxidativo
32	beta-enolasa isoforma 1	2,55	Actividad fosfopiruvato hidratasa	Glicólisis
33	beta-enolasa isoforma 1	2,38	Liasa Metaloenzima	Gluconeogénesis
40	Proteína aldolasa A	1,59	Cataliza la reacción adol	Glicólisis
41	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,74	Unión de actina, fructosa, tubulina y proteínas idénticas Actividad fructosa bifosfato Liasa. Proteína de esqueleto	Glicólisis. Gluconeogénesis
43	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,75		Proceso de biosíntesis de ATP
44	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,78		Organización del filamento de actina
45	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,73		Proceso metabólico bifosfato
42	Creatina quinasa tipo M	2,84		Quinasa transferasa. Unión de ATP. Actividad de creatina quinasa
46	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1,52	Unión de NAD. Actividad fosforilativa de NAD ⁺ Actividad peptidil-cisteína S-nitrosilasa Unión de proteínas	Proceso metabólico de la creatina
48	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1,61		Glicólisis. Gluconeogénesis Peptidil-cisteína S-nitrosilación Estabilización proteica. Apoptosis
51	Malato deshidrogenasa, citoplasmático	1,56	Actividad de L-malato deshidrogenasa Actividad de enzima málico	Ciclo del ácido tricarbóxico Gluconeogénesis
64	Triosa fosfato isomerasa	1,7	Actividad de la triosa fosfato isomerasa Isomerasa	Glicólisis.
65	Triosa fosfato isomerasa	1,63		Gluconeogénesis Intercambio de Pentosa fosfato
70	Glutatión S-transferasa P	1,96	Transferasa, actividad reguladora de las quinasa Unión de la JUN quinasa, de S-nitrosoglutatión, del complejo de hierro nitrosil y del óxido nítrico. Actividad de glutatión transferasa	Metabolismo de los xenobióticos y glutatión. Anti-apoptosis Regulación de la vías de TNF, MAPK, NF-kappa B y JUN quinasa Regulación de la respuesta inflamatoria. Regulación del estrés oxidativo.
85	Cadena pesada 8 de la dineína axonemal	1,59	Proteína motora. Unión de ATP. Actividad ATPasa	Movimiento basado en el microtúbulo

Tabla 17. PROTEÍNAS DE RATÓN

Núm. spot	Nombre proteínas	Ratio	Función molecular	Proceso biológico
9	Quininógeno-1	1,72	Inhibidor de la proteasa y de la tiol proteasa. Actividad inhibitoria de la endopeptidasa del tipo cisteína. Vasoactivo. Vasodilatador	Coagulación de la sangre. Respuesta inflamatoria Vasodilatación
2	Suero de albúmina	1,61	Unión del ADN Unión de drogas Unión de fosfato de piridoxal Unión de toxinas	Respuesta celular a la inanición Mantenimiento de la localización mitocondrial Regulación negativa de la apoptosis Transporte
3	Suero de albúmina	1,68		
10	Suero de albúmina	1,81		
11	Suero de albúmina	1,76		
12	Suero de albúmina	1,62		
13	Suero de albúmina	1,7		
14	Suero de albúmina	1,75		
16	Suero de albúmina	1,7		
17	Suero de albúmina	1,52		
19	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,78		
23	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,85		
25	Piruvato quinasa isoenzima M1/M2	1,71		
21	Calreticulina	-1,51	Se une a proteínas mal plegadas y previene su transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Chaperona	Arresto del ciclo celular. Regulación negativa de la transcripción y la translación, y regulación positiva de la replicación del ADN. Inhibe crecimiento celular, neovascularización e aumenta la inmunogenicidad.
22	<i>Lambda-Crystallin</i> homóloga	2,03	Oxidoreductasa. Actividad 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Actividad L-gulonato 3-deshidrogenasa. Actividad NAD+	Proceso metabólico de los ácidos grasos
32	Beta-enolasa	2,55	Actividad fosfopiruvato hidratasa Liasa. Metaloenzima	Glicólisis Gluconeogénesis
33	Beta-enolasa	2,38		
38	Creatina quinasa tipo M	3,12	Quinasa transferasa. Unión de ATP. Actividad de creatina quinasa	Proceso metabólico de la creatina
39	Creatina quinasa tipo M	3,04		
42	Creatina quinasa tipo M	2,84		
40	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,59	Unión de actina, fructosa, tubulina y proteínas idénticas Actividad fructosa bifosfato Liasa. Proteína de esqueleto	Glicólisis. Gluconeogénesis Proceso de biosíntesis de ATP Organización del filamento de actina Proceso metabólico bifosfato Activación y degranulación de las plaquetas Homotetramerización proteica
41	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,74		
43	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,75		
44	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,78		
45	Fructosa bifosfato aldolasa A	1,73		
42	Receptor nuclear subfamilia 2 grupo E miembro 1	2,84		
46	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1,52	Unión de NAD. Actividad fosforilativa de NAD ⁺ Actividad peptidil-cisteína S-nitrosilasa Unión de proteínas	Glicólisis. Gluconeogénesis Peptidil-cisteína S-nitrosilación Estabilización proteica. Apoptosis
48	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1,61		
51	Malato deshidrogenasa, citoplasmático	1,56	Actividad de L-malato deshidrogenasa. Actividad de enzima málico	Ciclo del ácido tricarbóxico. Gluconeogénesis
53	L-lactato deshidrogenasa cadena A	1,93	Oxidoreductasa. Unión de proteínas. Actividad de L-lactato deshidrogenasa	Respuesta celular a estímulos extracelulares. Glicólisis
64	Triosa fosfato isomerasa	1,7	Actividad de la triosa fosfato isomerasa Isomerasa	Glicólisis. Gluconeogénesis Intercambio de Pentosa fosfato
65	Triosa fosfato isomerasa	1,63		
66	Apolipoproteína A-I	1,52	Unión de lípidos, proteínas, colesterol, enzimas, β-amiloide, fosfolípidos, proteínas idénticas, receptor ApoA1 y receptor HDL.	Metabolismo del colesterol, lipídico, de esteroides y lipoproteínas Transporte. Transporte lipídico
71	Adenilato quinasa isoenzima 1	2,33	Quinasa. Transferasa. Unión de ATP Actividad del Adenilato quinasa	Proceso metabólico del ATP. Síntesis de nucleótidos Arresto del ciclo celular
85	Queratina, tipo II citoesquelética 8	1,59	Unión de proteínas. Actividad de molécula estructural	Apoptosis. Supervivencia celular. Inflamación. Inmunidad. Vía de señalización mediada por TNF

Discusión

Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de proliferar a través de la producción anormal de factores de crecimiento y/o de un exceso de función intrínseco de sus receptores. En distintos tipos de cáncer, sobretodo en la mayoría de los cánceres epiteliales, la expresión de la vía de señalización del EGFR confiere una mayor agresividad, convirtiendo su bloqueo en una de las estrategias antitumorales más prometedoras en el tratamiento del cáncer mediante fármacos selectivos contra dianas biológicas (Ciardiello and Tortora, 2008; Harari, 2004). Sin embargo, la existencia de mecanismos de *by-pass* (resistencias intrínsecas o adquiridas) al bloqueo de EGFR provoca que no todos los pacientes tratados con terapias anti-EGFR se beneficien del tratamiento, lo que señala la necesidad de diseñar nuevas estrategias terapéuticas para superar estas resistencias (Bianco *et al.*, 2007; Camp *et al.*, 2005; Kruser and Wheeler, 2010).

El objetivo principal de este proyecto fue evaluar si el uso de inhibidores de SRC podría potenciar el efecto antitumoral de la combinación de radioterapia y cetuximab.

Sobre el modelo experimental.

La complejidad de los sistemas biológicos de los que están dotadas las células y, en particular, las células transformadas, frecuentemente dan lugar a la redundancia y al solapamiento de vías de señalización asociadas a la proliferación y supervivencia celular. Esto, permite que las células tumorales sorteen los efectos terapéuticos de fármacos selectivos contra determinadas dianas (Amit *et al.*, 2007). La complementariedad entre las vías de señalización es una causa de resistencia y conlleva un gran desafío para la efectividad terapéutica de las terapias anti-EGFR (Lu *et al.*, 2007; Mendelsohn and Baselga, 2000; Mendelsohn and Baselga, 2003).

En este estudio se ha usado la línea celular A431 como modelo tumorigénico. Las células A431, procedentes de un carcinoma escamoso humano, sobreexpresan el EGFR (Ahsan *et al.*, 2009). Este hecho, junto con ser un modelo caracterizado y usado anteriormente en nuestro grupo para el estudio de la inhibición de EGFR (de Llobet *et al.*, 2012; Pueyo *et al.*, 2010), hicieron que lo empleara como modelo en este proyecto. Aun así, y para fortalecer los resultados que pudiéramos ir obteniendo, decidimos usar una segunda línea celular, FaDu, también procedente de un carcinoma escamoso humano y con la mitad de la sobreexpresión de EGFR que la de las células A431 (Saki *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2009).

1.- Generación de resistencias al C225.

Un hecho relevante en esta investigación fue la generación de 2 líneas resistentes a cetuximab. La obtención de los tipos resistentes dio lugar a la posibilidad de evaluar *in vivo* la reversibilidad de la resistencia, así como evaluar mecanismos asociados a estas resistencias. Sin embargo, el descubrimiento de que dasatinib tenía un efecto antagónico en células no resistentes desplazó el interés de la investigación hacia el estudio de las causas de este efecto, más que hacia la reversión de las resistencias al cetuximab, dado que el tratamiento con dasatinib en combinación con cetuximab quedaría cuestionado por la falta de un marcador clínico de sensibilidad al cetuximab y el consecuente riesgo de empeorar la evolución de los tumores.

Independientemente de la aplicabilidad clínica inmediata, algunos aspectos diferenciales de las células resistentes se desvelaron tras la exploración de los niveles de activación de la vía del EGFR y de proteínas *downstream*. Esto nos ha permitido caracterizar los cambios entre líneas y evaluar mecanismos asociados al fenotipo resistente:

- El primer hallazgo interesante, que confirmó lo ya descrito por Lu y colaboradores (Lu *et al.*, 2007), fue la disminución de receptor EGFR, la disminución de los niveles de fosfotirosinas de este receptor y la ausencia de respuesta al ligando EGF. Una explicación para estos hallazgos es que el bloqueo crónico por exposición continua al C225 haría innecesaria la presencia de EGFR por lo que este receptor sufriría una disminución en su síntesis o un exceso de degradación y reciclado. Por otra parte, la aparición de vías de señalización alternativas permitiría prescindir de la vía de transducción de señales del EGFR.
- Otro resultado observado y en concordancia con la elevada capacidad clonogénica y el crecimiento tumoral de las células R respecto las WT, fue que mientras en la línea resistente ni el receptor ni las proteínas *downstream* ERK y AKT se inhibían en presencia de C225, en la línea parental la inhibición era muy eficiente. Estos resultados se ven confirmados por los estudios de otros grupos (Benavente *et al.*, 2009; Guix *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2007).

En conjunto, estos datos sugieren que la resistencia estaría fuertemente ligada a la aparición de vías de señalización alternativas al EGFR.

Aparte de resaltar las diferencias en las vías de señalización asociadas a la resistencia a cetuximab hay 4 aspectos que merecen ser comentados específicamente:

1. *Sobre el método usado para conseguir el fenotipo resistente.*

El método desarrollado en cultivo celular durante 14 semanas para generar una población resistente a cetuximab se caracterizó respecto otros estudios por ser una metodología más simple, generada en un periodo de tiempo menor y sin la selección clonal de una población más agresiva (Benavente *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2007; Vilorio-Petit *et al.*, 2001). De estos 3 aspectos, evitar la selección clonal en el diseño experimental para establecer la línea celular resistente fue importante porque si hubiéramos seleccionado una población determinada hubiéramos podido seleccionar también un fenotipo más agresivo como consecuencia de una adaptación a la selección (de manera Darwiniana) independiente de la resistencia a C225. Además, mediante el uso de la selección, podríamos enmascarar atributos dependientes de C225 que podrían ser importantes en la adquisición de la resistencia. Asimismo, haber procedido de esta manera parece más cercano a lo que puede suceder en el seno de un tumor.

2. *Sobre la estabilidad del fenotipo resistente in vitro.*

La elevada capacidad clonogénica que mostraban las células resistentes en presencia de cetuximab no se modificó cuando estas líneas celulares se mantuvieron durante 5 semanas en un medio sin cetuximab indicando que el fenotipo resistente y, por lo tanto, los cambios (mecanismos) adquiridos con la exposición crónica a cetuximab eran estables.

3. *Traslación del fenotipo resistente a un modelo in vivo.*

Las células parentales y resistentes se inocularon en animales para determinar si el fenotipo observado *in vitro* era reproducible y se mantenía en un modelo experimental más complejo (*in vivo*). La reproducción del fenotipo resistente en los experimentos *in vivo* nos proporcionó una herramienta preclínica que puede ser usada como una aproximación para evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

4. *Sobre la implantación de fragmentos tumorales para reproducir la resistencia in vivo en A431.*

Es especialmente importante poner cierta atención en que cuando se procedió a la inoculación de células A431-WT y A431-R en el tejido subcutáneo y al tratamiento con cetuximab de los animales, los tumores derivados de células WT crecían más que los tumores derivados de células resistentes. Este hecho desconcertante en comparación con las células

FaDu, pudo entenderse al ver que para demostrar el fenotipo resistente *in vivo* en las células A431 era necesario implantar fragmentos tumorales previamente desarrollados en animales no tratados con cetuximab (en lugar de inocular células directamente en tejido subcutáneo). Existen varias opciones para explicar este comportamiento. Sin embargo, la que nos pareció más atractiva fue la necesidad de un microambiente adecuado (estroma asociado al tumor) para las células A431-R, lo que podría abrir una vía de investigación futura que consistiría en evaluar si durante la adquisición de resistencia las células se hacen más dependientes de factores propios de células estromales/elementos del estroma acelular. Su descubrimiento podría constituir una diana terapéutica en el futuro (letalidad sintética).

2.- Cooperación entre EGFR y SRC.

Paralelamente a la generación de tipos celulares resistentes a cetuximab, se exploró si la actividad de la proteína SRC podría ser una de las posibles causas de resistencia y/o vía de sensibilización frente a los inhibidores de EGFR. La existencia de estudios previos favoreció que nos decantáramos por dasatinib como inhibidor de SRC (Biscardi *et al.*, 1999; Camp *et al.*, 2005; Kloth *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Weickhardt *et al.*, 2010; Wheeler *et al.*, 2009).

Un resultado interesante fue la demostración de que EGFR se fosforila por la radiación independientemente del estímulo del ligando y que el uso de un inhibidor específico de SRC, como el PP2, puede inhibir la fosforilación radioinducida, sobretodo y específicamente en la tirosina 845. Precisamente esta tirosina EGFR es un sustrato de la quinasa de SRC en la línea celular A431 (Biscardi *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2003; Tice *et al.*, 1999). Que tengamos conocimiento, es la primera vez que se ha descrito la inducción mediada por la radiación de los dos receptores (EGFR y SRC) en la línea celular A431. Este resultado apoyó la hipótesis de trabajo inicial sobre que la inhibición de SRC podría potenciar el efecto antitumoral de la radioterapia y el C225.

Sobre la evaluación de la citotoxicidad de los fármacos *in vitro*.

En este trabajo se ha examinado a través de 3 ensayos diferentes el efecto del DST en combinación con C225. Se demostró la sensibilidad al DST y una re-sensibilización al C225 inducida por DST en las células resistentes lo que indica una posible dependencia celular de la proteína SRC y, como consecuencia, que SRC podía tener un papel importante en la resistencia, en consonancia con otros estudios (Li *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien la adición de DST al C225 dio lugar a un sinergismo en los ensayos

clonogénicos y a una inhibición de la viabilidad celular en las líneas parentales, cuando las líneas parentales se sometieron a un ensayo de proliferación, la combinación de ambos fármacos indujo un incremento del número de células.

Un posible motivo por el cual creemos que observamos respuestas opuestas a la combinación de C225 y DST entre los ensayos de citotoxicidad es la confluencia de los cultivos. En los ensayos de proliferación los cultivos estaban en semiconfluencia y por tanto con un mayor número de células. Este hecho favorece mayores niveles de secreción autocrina y de contacto célula-célula con la consiguiente estimulación de la división celular y supervivencia. En cambio, el ensayo clonogénico se realizó con la siembra de células individuales donde su supervivencia depende exclusivamente de la capacidad que tiene una única célula de originar una familia de descendientes.

Una vez discutidos los resultados más relevantes sobre el tratamiento farmacológico *in vitro*, pasaremos a comentar tres aspectos que se han querido señalar separadamente.

1. *Sobre la reducción de la dosis de DST en la línea FaDu-R.*

Cuando se testó la dosis de 20 nM de DST en combinación con C225 se observó una formación de colonias tan baja en las células resistentes que se decidió reducir la dosis de DST administrada en estas líneas para poder evaluar el efecto de la combinación.

2. *Sobre la diferente sensibilidad al DST de la línea FaDu-WT en comparación con la línea FaDu-R.*

La reducción de la formación de colonias observada con la dosis de DST de 2 nM en la línea FaDu-WT fue nula (Figura 19B, página 90). Fue necesario aumentar la dosis de DST de 2 a 20 nM para poder observar un efecto citotóxico (Figura 20 página 91). Esta observación sugiere que las células FaDu-R tienen una mayor dependencia de SRC.

3. *Sobre el elevado error estándar en los resultados obtenidos en la línea FaDu-R.*

El promedio y el error estándar que se obtuvieron al evaluar la combinación de C225 y DST (Figura 21B, página 91) provienen de dos experimentos independientes. A pesar de que cada experimento, individualmente, presentaba un efecto sinérgico, los valores de la supervivencia celular de cada punto evaluado en estos experimentos diverge significativamente el uno del otro. Por eso, cuando se realizó el promedio de los valores de cada punto ($n = 2$) se obtuvo un elevado error estándar. Este error estándar se podría haber mejorado incrementando el número de experimentos realizados.

Sobre aspectos relacionados con el modelo experimental *in vivo*.

Hay tres aspectos relacionados con los experimentos *in vivo* que requieren ser comentados: el desarrollo de una metodología para irradiar ratones, la generación de tumores tratados durante 3 días para los estudios bioquímicos, de proteómica e histológicos y la aparición de hemorragias cutáneas en los ratones tratados con dasatinib.

Desarrollo de una metodología para irradiar ratones.

Debe mencionarse que la investigación sobre el uso de la radioterapia combinada con nuevos fármacos puede requerir la irradiación de ratones inmunodeprimidos a los que se han trasplantado tumores humanos (GG, 1987; Milas *et al.*, 2007). La puesta a punto de esta metodología fue necesaria en este trabajo, no sin aportar soluciones a las dificultades técnicas inherentes a este tipo de experimentos (Baro *et al.*, 2012). Los obstáculos fundamentales con los que nos encontramos fueron la falta de instalaciones específicas para irradiar ratones, el riesgo de infección debido a las repetidas salidas de los ratones de la zona libre de patógenos (radioterapia fraccionada), la posible toxicidad radioinducida y el manejo de un número elevado de animales a los que anestesiarse.

***** Sobre cómo se disminuyó el riesgo de infecciones y la toxicidad sistémica por radioterapia.*

Tanto los riesgos de infección como los de toxicidad aguda por radiación se minimizaron mediante las siguientes medidas:

- a) Rapidez. La irradiación de hasta 30 ratones a la vez, disminuyó el tiempo fuera de una zona libre de patógenos (en comparación con la irradiación de los ratones de uno en uno).
- b) Manipulación estéril en la sala de cuarentena y en el búnker de radioterapia. El montaje para irradiar ratones está diseñado para que lo realicen 2 personas, una de las cuales se encarga de las maniobras que no requieren esterilidad y la otra de las que sí (uso de tallas estériles, gorros quirúrgicos, mascarillas y guantes estériles).
- c) Irradiación selectiva. Se limitó el campo de radioterapia a la pata trasera derecha (donde estaban implantados los tumores), evitándose los efectos agudos de la radiación sobre el resto del animal. Para ello, además de usar el límite del haz de

radiación, los animales se anestesiaron en cada una de las 10 sesiones que se les aplicó la radioterapia.

**** *Medidas se tomaron para verificar la calidad del proceso.*

- a) Reproducción en las dosimetrías. Se demostró una baja variabilidad tanto inter-como intra-experimental.
- b) Supervisión de la calidad de vida de los ratones. La ausencia de enfermedades infecciosas y la falta de toxicidad inducida por la radiación fueron decisivas para garantizar la finalización de los experimentos en el momento planificado.

Generación de tumores tratados 3 días para los estudios bioquímicos, de proteómica e histológicos.

En un estudio previo llevado a cabo en nuestro grupo (Pueyo *et al.*, 2010), observamos que en tumores avanzados ($\approx 1000 \text{ mm}^3$) no se encontraban diferencias a nivel histológico o bioquímico en función del tratamiento recibido (sin o con cetuximab), mientras que estas diferencias sí se identificaban en tumores iniciales, más pequeños ($\approx 100 \text{ mm}^3$). Este hecho motivó que en el presente trabajo tomásemos la decisión de evaluar los posibles cambios inducidos por el tratamiento con dasatinib en tumores iniciales, es decir, tras haber recibido 3 días de tratamiento y haber dejado pasar 24 h después del tratamiento. Con esta decisión asumimos que los cambios que determinan el fenotipo tumoral inducido por un tratamiento serían más patentes en fases tempranas que en fase tardías.

Sobre las hemorragias inducidas por dasatinib.

El mecanismo de acción por el cual DST provocó petequias en los ratones es aún desconocido. La cinética de aparición y desaparición rápida sugieren una inactivación de la agregación plaquetaria. Este efecto puede ser atribuido a la inhibición de la familia SFKs por DST. Así, la activación de las plaquetas por la señalización a través del motivo ITAM (motivo de activación basado en tirosinas) del receptor Fc gamma, depende de la proteína Lyn (miembro de la familia SFKs), que además, regula la activación de las plaquetas mediante el complejo formado por el factor Willebrand (VWF) y la glicoproteína Ib-IX-V (Gratacap *et al.*, 2009).

Es interesante resaltar que el quinínogeno-1, una proteína que se encontró incrementada en el estroma de los tumores tratados con DST, se une al complejo glicoproteico Ib-IX-V inhibiendo la unión de la trombina a las plaquetas y, consecuentemente, la agregación

plaquetaria inducida por la trombina (Bradford *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que las SFKs tienen un papel en la activación plaquetaria y su inhibición por DST en la inducción de los trastornos hematológicos.

No obstante, debido a que el DST tiene actividad contra el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), se ha sugerido que también podría estar éste relacionado con el mecanismo de acción por el cual se producen las hemorragias, ya que en embriones de ratón con deficiencia de PDGFR- β se han observado deficiencias en capilares y los pericitos que se asocian a microaneurismas y hemorragias (Lindahl *et al.*, 1997).

Las observaciones de este estudio contrastan con el mecanismo de acción descrito por Mazharian y colaboradores (Mazharian *et al.*, 2011), ya que en su estudio proponen que DST causa trombocitopenia como consecuencia de una trombopoyesis ineficiente que promueve la diferenciación de los megacariocitos pero no su migración ni la formación pro-plaquetaria. Este mecanismo, en el que la recuperación de los niveles basales de las plaquetas después de la trombocitopenia inducida por DST tiene lugar en días, no concuerda con la rápida formación (2 h) y reversibilidad (menos de 24 h) de las petequias que observamos en nuestros ratones tratados con DST. Otro aspecto que contrasta con el estudio de Mazharian y colaboradores (Mazharian *et al.*, 2011), es la falta de latencia y empeoramiento de las hemorragias petequiales que observamos en los ratones, en los cuales a medida que reciben una nueva dosis de DST disminuye el número de petequias. Estos datos y los mecanismos asociados a la inhibición de SRC y PDGFR- β mencionados anteriormente sugieren que DST interferiría con la eficiencia de la agregación plaquetaria y no con el mecanismo descrito por Mazharian y colaboradores (Mazharian *et al.*, 2011).

Un aspecto que no hemos podido estudiar es si existe alguna relación entre la aparición de petequias y el efecto antagónico. En un plano especulativo, se podría presuponer que ambos fenómenos tienen en común un efecto biológico que promueve una acción positiva: se provoca en ambos casos una respuesta evocadora. En el caso de las petequias es la permeabilidad o diapédesis transvascular. En caso de los tumores un crecimiento acelerado. Todo ello podría ser consecuencia de la inhibición por dasatinib de algún regulador negativo común.

Sobre el por qué de los cambios de la hipótesis inicial.

En este estudio, hemos evaluado la hipótesis de si el inhibidor de SRC dasatinib podría potenciar la eficacia antitumoral de la combinación de radioterapia y C225. Es bien sabido que la interacción entre EGFR y SRC actúa sinérgicamente (Tice *et al.*, 1999) y por ello se puede suponer que cetuximab y dasatinib se potencien. El hecho que dasatinib sea un fármaco presente en la clínica, que se conozcan sus perfiles de actividad anti-quinasa y su toxicidad en humanos, y queriendo aplicar en la clínica los hallazgos de nuestra investigación, motivó que decidiéramos usar dasatinib como anti-SRC de entre los fármacos anti-SRC que existen.

Distintos hechos apoyaron la hipótesis inicial. A parte de la interacción de EGFR/SRC a nivel de membrana, durante el trabajo experimental otros grupos describieron que SRC es necesario para la internalización y traslocación de EGFR al núcleo, donde participa en la reparación del ADN y confiere resistencia (Toulany and Rodemann, 2010). Además, se demostró que la radiación ionizante induce la traslocación del EGFR al núcleo (Dittmann *et al.*, 2009a). Estas observaciones a favor de la hipótesis de trabajo se complementaron con datos de estudios preclínicos publicados en el transcurso de nuestra investigación. Así, en cáncer de mama, se observó un sinergismo entre dasatinib y EBIP, una proteína de fusión que inhibe la familia de receptores ErbB (Nautiyal *et al.*, 2010), entre DST y trastuzumab en células que sobreexpresan HER2/Neu (Seoane *et al.*, 2010), y entre DST y trastuzumab en células resistentes a trastuzumab (Mitra *et al.*, 2009). En cáncer de colon, se comprobó que en células con mutaciones a *KRAS*, y por tanto resistentes a C225, DST podía resensibilizar frente a cetuximab (Dunn *et al.*, 2010). Paralelamente, también se observaron resultados similares con otros inhibidores de SRC, como AZD0530 o SKI-606 (Kim *et al.*, 2010; Saad, 2009). En conjunto todo indicaba que la hipótesis de que DST podía ser un agente potenciador del cetuximab en combinación con radioterapia sería probablemente cierta, tanto por las ideas de las que partimos como de los nuevos resultados publicados a los largo de la ejecución de la tesis. Un reflejo de ello son los ensayo clínicos en curso (Kim *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2011) (ver también anexo 3 pagina 189). Sin embargo y en contra de lo que esperábamos, la adición de DST dio lugar a un aumento del crecimiento y a una mayor malignidad de los tumores xenoinplantados, poniendo de evidencia que la hipótesis de trabajo no se confirmaba como cierta, al menos según el método experimental empleado.

Entonces la reorientación del trabajo de la tesis fue ineludible. En este momento se presentó el dilema de si continuar la investigación utilizando las células resistentes al

cetuximab para evaluar qué efecto tendría el dasatinib o si emprender la búsqueda de mecanismos que explicasen el efecto antagónico del dasatinib. Se tomó la decisión de seguir por la última opción. Ante la falta de un marcador clínico de sensibilidad al cetuximab, el tratamiento con dasatinib en combinación con cetuximab podría ser cuestionado por el consecuente riesgo de empeorar la evolución de los pacientes con tumores que pudieran comportarse como las células de nuestro modelo experimental. Por otra parte, el investigar los mecanismos subyacentes al efecto antagónico tiene de atractivo la posibilidad de hallar dianas terapéuticas a modo del concepto de letalidad sintética.

Sobre aspectos técnicos del western blot.

DST es un inhibidor tirosina quinasa con actividad contra múltiples dianas como ABL, la familia de las SRC quinasas (SRC, LCK, HCK, FYN, YES, FGR, BLK, LYN y FRK), el receptor tirosina quinasa c-KIT, el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) alfa y beta, y las efrinas (Montero *et al.*, 2011). En los experimentos de este trabajo se usó una dosis de 150 nM de DST *in vitro* basándose en los datos publicados por Lombardo y colaboradores (Lombardo *et al.*, 2004). Esta dosis inhibe la mayor parte de las dianas mencionadas por lo que no es posible atribuir los efectos del DST a la inhibición exclusiva de SRC. Este fue el motivo principal para tratar de reproducir los resultados, como efectivamente se realizó, con un inhibidor específico de SRC, el PP2. Hay que decir que a pesar de ser un inhibidor mucho más específico, el PP2 es un agente químico que puede modificar otras proteínas además de SRC y que una mejor opción para confirmar que el efecto antagónico es consecuencia directa de la inhibición de SRC hubiera sido el uso de técnicas de bloqueo del gen (v.gr. mediante el uso de siARN anti-SRC).

Sobre los mecanismos que están involucrados en el efecto antagónico del dasatinib.

Los mecanismos moleculares que se recogen a continuación probablemente influyeron en que los tumores de los animales tratados con dasatinib crecieran de forma más rápida y con un comportamiento más agresivo.

1. DST inhibe la cooperación entre EGFR y SRC pero no frena la señalización downstream.

El tratamiento de las células en cultivo con DST (o PP2) inhibió la fosforilación de la tirosina 845 de EGFR. Sin embargo, la administración de DST, solo o combinado con C225, no frenó la activación de las quinasas ERK1/2, AKT o STAT3 dependientes de EGFR, ni en los experimento *in vitro* ni en los *in vivo*.

2. *DST induce la señalización de ERK y AKT.*

El tratamiento de los cultivos con DST (o PP2) no solo no inhibió a las proteínas ERK1/2, AKT y STAT3 sino que se asoció a un incremento de su activación sobre todo de ERK1/2 y AKT. Que el aumento puede atribuirse a la inhibición de SRC quedó de manifiesto al reproducir mediante PP2 los cambios inducidos por DST, a la vez que conectaba la inhibición de SRC con la malignización de los xenoinplantos.

En ambas líneas, el incremento de ERK 1/2 se demostró *in vitro* e *in vivo*. Respecto a este aumento inducido por DST, son diversos los estudios en los que ya se describe que la inhibición de SRC (con DST o PP2) conduce a una activación paradójica de la vía RAF/MEK/ERK en CML y ponen de manifiesto una interacción sintética letal que puede ser usada como estrategia terapéutica: combinación de inhibidores de SRC y de MEK1/2 (Congleton *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2007; Packer *et al.*, 2011).

Asimismo, en la línea FaDu se demostró un incremento de AKT *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, en la línea A431 tan solo se demostró *in vitro*. *In vivo* se observó un incremento de la proteína p70S6K *downstream* de AKT. La implicación de AKT y de su vía de señalización en el efecto antagónico inducido por la inhibición de SRC, se ha convertido en un aspecto relevante de este estudio ya que la única publicación, que tengamos conocimiento, a parte de nuestro estudio en la que se asocia la inhibición de SRC con el incremento concomitante de ERK1/2 y AKT fue la publicada por Lin y colaboradores (Lin *et al.*, 2012).

3. *DST induce un aumento de la actividad tirosina quinasa del EGFR.*

El incremento en la fosforilación de la tirosina 1068 del EGFR (dependiente del propio EGFR) tras el tratamiento de los cultivos con DST (o PP2), sugiere que el efecto antagónico puede proceder de un incremento de actividad de la TK del EGFR.

Descartamos mediante citometría de flujo que DST disminuyera la internalización del EGFR lo que produciría una mayor disponibilidad de receptores en la superficie celular que pudieran ser activadas por el ligando EGF (Li *et al.*, 2009). Tampoco se vio un aumento en los niveles de fosforilación de la Caveolina inducido por DST que indicara una mayor internalización y transporte del EGFR hacia el núcleo (Khan *et al.*, 2006).

No obstante, recientemente, se ha descrito que las células insensibles a DST, a diferencia de las sensibles, reaccionan al tratamiento con DST con una activación de EGFR en la tirosina 1068. Activación que es aún más marcada tras la exposición a EGF, y que es

responsable de la fosforilación de ERK y AKT y de suprimir la apoptosis (Lin *et al.*, 2012). Este mecanismo descrito por Lin y colaboradores es consistente con los resultados obtenidos en nuestras líneas celulares, como sería de esperar ya que ambas líneas son insensibles a DST.

4. DST induce la activación de la proteína RAS (Figura 73).

Los mecanismos por los que DST podría inducir la activación de RAS son:

- a) Inducción de BRAF y CRAF.
- b) Inhibición de la regulación (feed-back loop negativo) de la TK de EGFR.

Lo primero que se descartó es que las líneas celulares de estudio presentasen mutaciones en el gen *k-Ras*. Aproximadamente un 30 % de los tumores humanos contiene alguna de las tres versiones mutadas del gen humano de *Ras* (*H-Ras*, *K-Ras* o *N-Ras*) (Takai, Sasaki *et al.* 2001), donde las mutaciones de *K-Ras* especialmente en el codón 12 y 13 son las que más contribuyen a la respuesta clínica de los fármacos en pacientes de cabeza y cuello. Una vez descartada esta posibilidad, la investigación se centró en la evaluación de la actividad de RAS. RAS se consideró una proteína candidata a estudio porque ERK y AKT que requieren de RAS se vieron afectados a la vez por el efecto antagónico inducido por DST (Grana, Rusyn *et al.* 2002) y porque de observarse que la actividad de RAS fuera patológica se podría delimitar en los primeros pasos de la vía de señalización el origen del efecto antagónico tras el bloqueo de SRC. Efectivamente pudimos demostrar que los niveles de RAS-GTP se encuentran aumentados tras el tratamiento con DST. Consistente con este mecanismo de acción observamos un incremento en la fosforilación de la tirosina 1068 del EGFR (lugar de acoplamiento de la proteína adaptadora Grb2 la cual está implicada en la activación de RAS). Esto hace pensar que un regulador negativo de RAS o un regulador *upstream* de RAS (como una fosfatasa) podía ser activado por las quinasas de SRC cuya inhibición prevendría o aliviaría un *feed-back loop* negativo que controlaría la vía de EGFR/RAS y, consecuentemente, AKT y ERK. Otros mecanismos podrían estar también implicados en la activación de RAS ante una inhibición de SRC. En células NIH 3T3, la inhibición de SRC con PP2 indujo una activación sostenida y continua de RAF que condujo al incremento de la fosforilación de ERK1/2 (Lee, Kim *et al.* 2004). En células resistentes de leucemia mieloide crónica, la débil actividad inhibitoria de DST contra RAF conduce, de forma dependiente de RAS, a una activación paradójica de BRAF y CRAF resultando en la hiperactivación de ERK1/2 (Packer, Rana *et al.* 2011), sugiriendo que los tumores impulsados por RAS o con una respuesta parcial podrían ser refractarios al

tratamiento con DST. Ese mecanismo se podría actuar en nuestro modelo experimental, en el cual C225 causa sólo una inhibición parcial de RAS-GTP.

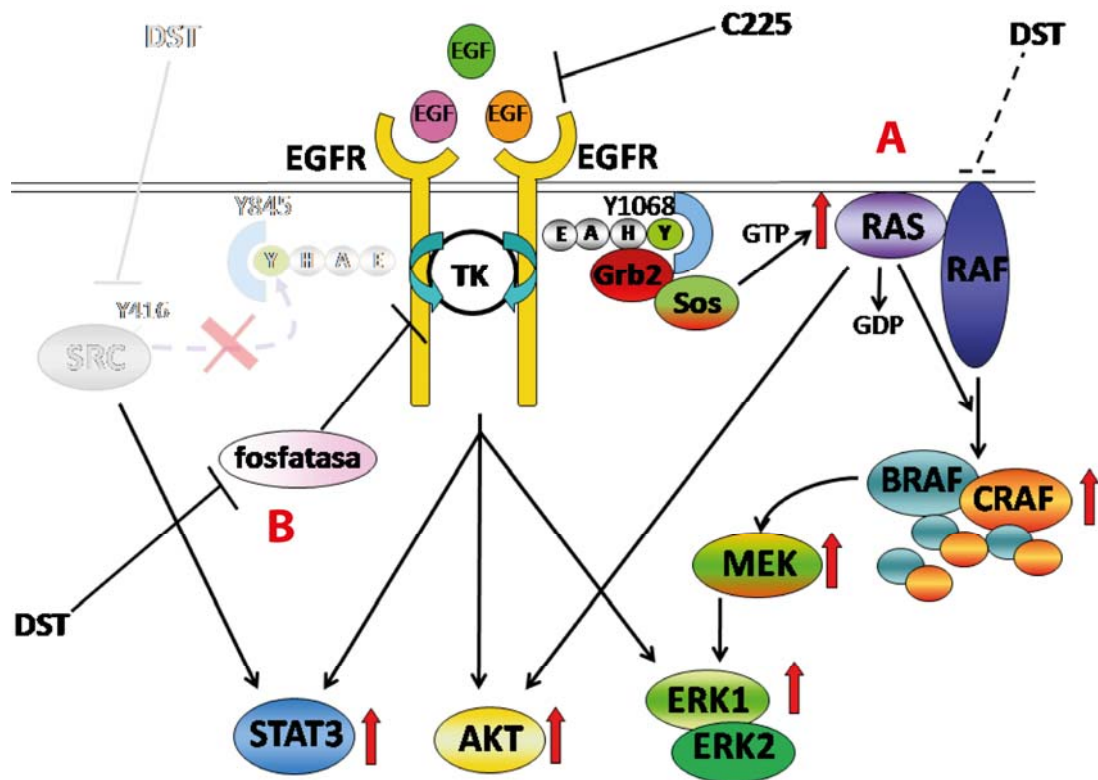


Figura 73. Posibles mecanismos por los que DST incrementaría la función de RAS. (a) Inhibición de la regulación de la TK del EGFR; (b) Inducción de BRAF y CRAF. Abreviaturas: DST, dasatinib; C225, cetuximab; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGF, factor del crecimiento epidérmico; TK, tirosina quinasa; SRC, sarcoma; AKT, proteína quinasa B; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK1/ERK2, quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; RAS, *rat sarcoma*; RAF, quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina; BRAF, quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina B; CRAF, quinasa proto-oncogénica de la serina/treonina C; MEK, Proteína quinasa activada por mitógenos; Grb2, proteína 2 de Unión al Receptor de Factores de Crecimiento; Sos, *Son of sevenless*; GDP, Guanosín bifosfato; GTP, Guanosín trifosfato.

5. DST promueve la desfosforilación de la tirosina Y529 de SRC.

La fosforilación de la tirosina 529 en el dominio C-terminal de SRC, que depende de la tirosina quinasa CSK, mantiene la quinasa de SRC en una conformación cerrada e inactiva. La activación clásica de la vía de señalización de SRC incluye la desfosforilación de la Y529 (activación parcial) seguida de la autofosforilación de la tirosina 418 de SRC con lo que se alcanza una activación completa (Roskoski 2005) (Ver figura 5 de la introducción, pagina 23).

Tras la administración de DST o PP2 observamos *in vitro* e *in vivo* una desfosforilación de la tirosina 529. Esta observación es en cierto modo contradictoria con la inhibición de SRC puesto que cuando la tirosina 529 está poco fosforilada es cuando SRC puede autoactivarse

(mediante SRC pY418). DST podría interferir en el equilibrio sobre el grado de fosforilación de los centros reguladores de SRC decantando el estado funcional de SRC hacia una hipo o hiperfunción dependiendo del tipo celular o de la homeostasis celular. Algunos investigadores han observado que la desfosforilación de Y529 en un modelo de carcinogénesis de colon en ratas causó un incremento de la síntesis de ADN (BrdU) (Kunte, Wali et al. 2005). La regulación de SRC a nivel de la tirosina 529 no se conoce suficientemente, por lo que no se puede descartar que la desfosforilación de la Y529 pueda inducir una reacción compensatoria promitótica como la que hemos demostrado en este trabajo (Harrison 2003). Sin embargo, el estado de Y529 no parece por el momento asociarse con el grado de supervivencia de los pacientes en un estudio en cáncer de mama (Elsberger, Tan et al. 2010).

6. *DST induce la señalización de la proteína STAT3* (Figura 74).

Los mecanismos por los que DST puede inducir la activación STAT3 son:

- a) unión aberrante de JAK-STAT3
- b) Cooperación RAS-STAT3

La proteína STAT3 tiene un papel anti-apoptótico y pro-proliferativo (Grandis, Drenning et al. 2000). Se ha descrito que DST conduce a una inhibición inicial y poco duradera de STAT3 en la tirosina 705 la cual 24 h después se reactiva gracias a la inducción de una señalización compensatoria que suprime los efectos antitumorales de la inhibición de SRC y permite sobrevivir a las células tumorales (Johnson, Saigal et al. 2007; Byers, Sen et al. 2009; Sen, Saigal et al. 2009). Diversos autores llaman a este efecto *reactivación de STAT3* y lo asocian con una unión alterada de JAK-STAT3. Tras la inhibición de SRC, STAT5 es inhibida de forma duradera. La inhibición de STAT5A, pero no de STAT5B, reduce posteriormente la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 2 (SOCS2). SOCS2 inhibe la actividad de JAK2 y la unión de JAK2-STAT3. La sobreexpresión de SOCS2 es imprescindible para evitar la reactivación de STAT3 y potenciar los efectos citotóxicos de la inhibición de SRC. Este mecanismo o bucle de retroalimentación por la inhibición de SRC que conduce a la disminución de la expresión de SOCS2 a través de la inhibición de STAT5A, permite la activación y unión de JAK2 y STAT3 y el envío de señales de supervivencia (Sen, Peng et al. 2011).

La activación de STAT3 puede ser activado también a través de EGFR. Al menos existen 2 mecanismos de activación (relacionados con puertos de anclaje), uno dependiente de la Y845 de EGFR (SRC-inducido) y otro dependiente de la fosforilación de las tirosinas Y1086 y/o

Y1068 del EGFR, ambas implicadas en la activación de RAS (Shao, Cheng et al. 2003). Independientemente de la actividad de EGFR, la funcionalidad de STAT3 está indirectamente condicionada por RAS a través de ERK1/2. Se ha visto que la unión de STAT3 a los promotores génicos requiere de la fosforilación de STAT3 en la serina 727, que es dependiente de ERK1/2. A su vez, (a modo de un bucle de retroalimentación) los niveles de RAS dependerían de la fosforilación de la S727 de STAT3 que estimularían el promotor de *Ras* (Plaza-Menacho, van der Sluis et al. 2007). En nuestros modelos experimentales, la activación de RAS (y de ERK1/2 y AKT) inducida por DST podría haber actuado sobre STAT3 de un forma parecida.

Un aspecto relevante a comentar es que mientras que en los tumores A431 el aumento de la fosforilación de la serina 727 es más marcado, en los tumores FaDu la fosforilación se ve más marcada en la tirosina 705. Estos resultados observados en los tumores refuerzan la sospecha de la existencia de mecanismos distintos según la línea celular (A431 o FaDu) asociados a la inducción de STAT3 por la inhibición de SRC.

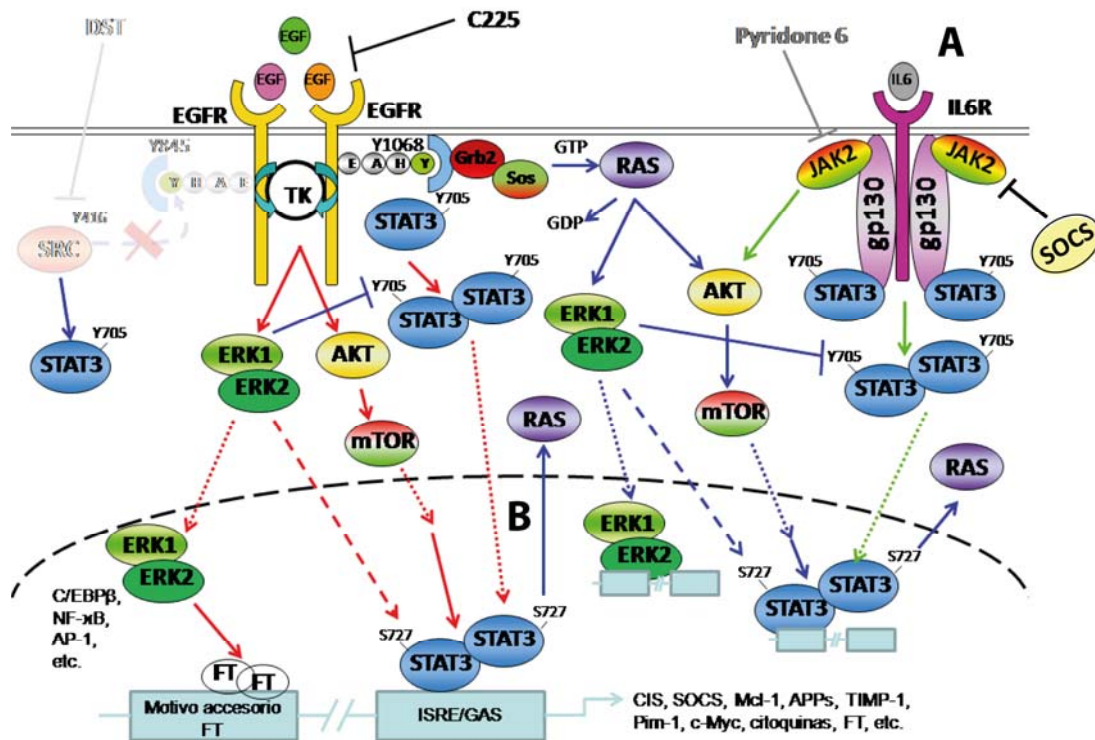


Figura 74. Mecanismos mediante los que DST induce la señalización a través de STAT3. (a) Unión aberrante de JAK-STAT3; (b) Cooperación de RAS-STAT3. Abreviaturas: DST, dasatinib; C225, cetuximab; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGF, factor del crecimiento epidérmico; TK, tirosina quinasa; SRC, sarcoma; AKT, proteína quinasa B; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK1/ERK2, quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; RAS, *rat sarcoma*; GDP, Guanosín bifosfato; GTP, Guanosín trifosfato; IL6R, receptor de la interleucina 6; IL6, interleucina 6; JAK2, *Janus quinasa 2*; gp130, glicoproteína 130; mTOR, *mammalian target of ramamycin*; FT, factor de transcripción.

7. *DST induce la secreción de VEGF.*

La radioterapia produce niveles elevados de secreción de VEGF (Pueyo, Mesia et al. 2010; de Llobet, Baro et al. 2012). Un resultado interesante de este estudio es que, a diferencia de otros trabajos en los que se describía que con la administración de DST se producía una inhibición de los marcadores de la angiogénesis como el VEGF (Trevino, Summy et al. 2006; Haura, Tanvetyanon et al. 2010), con DST se reactivó la secreción de VEGF previamente bloqueada C225.

8. *DST induce un aumento en la actividad metabólica.*

Previo a la discusión de los resultados obtenidos, debemos mencionar que el estudio del proteoma se realizó tan solo en xenoinjertos FaDu, donde el efecto antagónico era más marcado y la experiencia con la proteómica de las células A431, más compleja, aconsejó posponer el estudio de estos últimos tumores. Estos argumentos y el coste del estudio fueron los motivos principales por los cuales no se realizó la proteómica en los tumores A431.

La proliferación celular descontrolada de las células tumorales implica la ejecución de ajustes en el metabolismo energético con el fin de impulsar el crecimiento y la división celular (Hanahan and Weinberg 2011). Los resultados obtenidos mediante el estudio de proteómica son consistentes con esta observación y la subsiguiente reprogramación del metabolismo energético durante la malignización tumoral inducida por DST. Tras el tratamiento con DST, el fenotipo de las células A431 y FaDu pasó a ser más agresivo, proceso que se acompañó de cambios en los niveles de las principales enzimas encargadas de la obtención de energía en la célula. Diversas enzimas se vieron aumentadas tras el tratamiento con DST, entre ellas la enzima piruvato quinasa isoenzima M1/M2, la aldolasa A, la beta-enolasa, la L-lactato deshidrogenasa-A y la GADPH, implicadas en la glucólisis y en la gluconeogénesis, y otras enzimas esenciales para la biosíntesis de ATP (fructosa bifosfato aldolasa A, adenilato quinasa isoenzima 1), la vía de las pentosas (triosa fosfato), el ciclo del ácido tricarbóxico (malato deshidrogenasa), el metabolismo del colesterol (apolipoproteína A-I), y la creatina quinasa tipo M y la glutatión S-transferasa P.

El aumento de la glucólisis en las células tumorales asociado a un fenotipo más agresivo y a la resistencia a los tratamientos fue descrito en 1956 por Otto Warburg (Ver figura 11 de la introducción, pagina 36). Las células neoplásicas reprograman su consumo de glucosa, incluso en presencia de oxígeno, limitando el metabolismo energético a la glucólisis (efecto Warburg) (Warburg 1956). Esta reprogramación se realiza en parte vía transportadores de

glucosa que aumentan el flujo de glucosa hacia el citoplasma (Hanahan and Weinberg 2011) y de enzimas glucolíticas y del metabolismo intermediario, como la piruvato quinasa M1/M2 (PKM1/PKM2), que redireccionaría los carbonos de glucosa y la formación oxidativa de ATP para generar precursores esenciales de componentes celulares (Herling, König et al. 2011) de distintas rutas biosintéticas (como la vía de las pentosas, que puede ser usada para la biosíntesis de nucleótidos) las cuales facilitarían la síntesis de elementos necesarios para la formación de nuevas células (Ver figura 12 de la introducción, página 39).

La idea de que los fenotipos más agresivos se asocian con un metabolismo glucolítico (Potter 1958), recientemente revisada por Vander Heiden y colaboradores (Vander Heiden, Cantley et al. 2009), encaja con los resultados hallados en el estudio de proteómica de este trabajo. Los hallazgos de proteómica sugieren que, en respuesta al tratamiento con DST, las células tumorales (FaDu) además de exhibir una proliferación elevada modifican su metabolismo en concordancia con una mayor malignidad. A favor de este concepto cabe señalar los siguientes resultados: (1) aumento de la LDH en el sobrenadante de los cultivos celulares tratados con DST; este aumento de LDH reflejaría una mayor conversión de piruvato a lactato (principal componente del efecto Warburg). El lactato en el microambiente tumoral estaría acompañado de una acidosis local que facilitaría la invasión celular a través de la destrucción de las poblaciones de células normales adyacentes, la degradación de la matriz extracelular y la inducción de la angiogénesis (Herling, König et al. 2011). El piruvato, por su parte, contribuiría a disminuir las vulnerabilidades del daño oxidativo sobre las células tumorales (Herling, König et al. 2011). Efectos razonablemente presentes en tumores con un fenotipo agresivo y que contribuyen a explicar el mayor crecimiento tumoral, el aumento de la síntesis de ADN y el aumento de angiogénesis observados en nuestros modelos experimentales tratados con DST. (2) Las proteínas GLUT1, HIF1 α y p70 S6K relacionadas con la vía glucolítica se sobreexpresaron en tumores FaDu. Además, estas proteínas están asociadas con una mayor actividad de RAS y AKT. (3) El incremento de ERK1/2 inducido por DST observado en los Western blots se pudo relacionar con múltiples proteínas sobrerreguladas en el estudio de proteómica, como GADPH, GSTP, etc., las cuales o bien están inducidas por ERK1/2 o bien ERK1/2 interviene en el proceso biológico en el que están implicadas. (4) El incremento de AKT inducido por DST observado en los Western blots se pudo relacionar con un incremento en la proteína p70 S6K, la cual se encuentra *downstream* de AKT y es regulada por mTOR.

El mecanismo por el que DST modificaría el metabolismo en las células FaDu (Figura 75) podría iniciarse con la activación de RAS que estimularía un incremento del transporte celular de glucosa a través de la inducción de GLUT1. La activación de RAS también aumentaría los niveles de HIF1, que activarían las enzimas PKM2 y LDH. Además de RAS, la hiperactividad de AKT podría inducir la glucólisis a través de HIF1, de la fructosa bifosfato y del reclutamiento de los transportadores de glucosa a la superficie celular (Koppenol, Bounds et al. 2011). También a través de AKT se activaría el complejo I de mTOR (mTORc1) que incrementaría los niveles de la proteína S6K1 (*downstream* de p70 S6K), la producción de lactato e induciría la vía de la pentosa fosfato y la biosíntesis de lípidos (Duvel, Yecies et al. 2010). Respecto a los tumores A431 (Figura 75) creemos, por los resultados observados en los Western blots, que DST estimularía las vías metabólicas principalmente a través de las proteínas RAS y p70S6K.

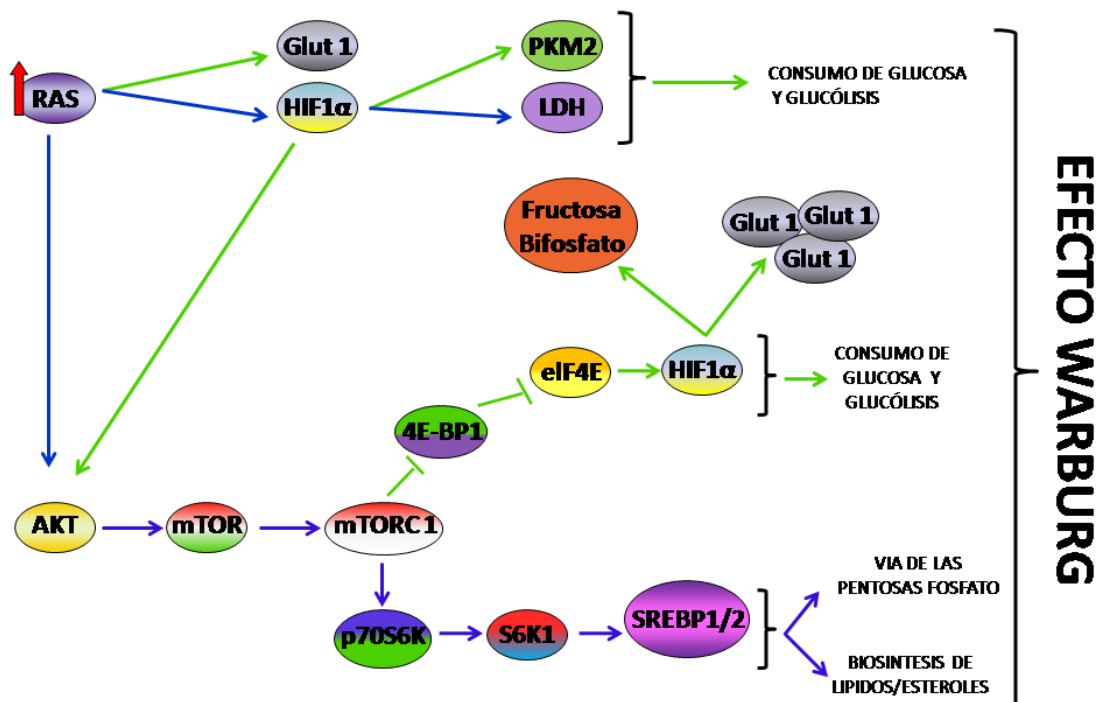


Figura 75. Mecanismos a través de los que DST induce el efecto Warburg. Abreviaturas: RAS, *rat sarcoma*; mTOR, *mammalian target of ramamycin*; mTORC1, complejo 1 de la *mammalian target of ramamycin*; Glut 1, transportador de glucosa 1; HIF1α, Factor inducible por hipoxia 1 alfa; LDH, lactato deshidrogenasa; PKM2, piruvato quinasa M2; p70 S6K, proteína ribosomal S6 quinasa 70 KDa; S6K1, proteína ribosomal S6 quinasa beta 1; SREBP1/2, proteína 1/2 de unión a los elementos reguladores de esteroides; 4E-BP1, factor represor de traducción eucariótica 4E de unión a proteína 1; eIF4E, factor de inicio de traducción eucariótica 4E de unión a proteína 1.

9. DST induce un aumento en los niveles de IGF2R (receptor del catión independiente de la manosa 6-fosfato).

De todas las proteínas que se detectaron mediante el estudio del proteoma *in vivo*, la proteína IGF2R/M6P nos llamó especialmente la atención. No está relacionada con el

metabolismo. Se ha descrito que su activación en algunos tumores podría activar la vía de MAPK/ERK1/2 a través del ligando IGF2 (El-Shewy *et al.*, 2007; McKinnon *et al.*, 2001), una vía que en nuestros modelos estaba claramente activada *in vitro* e *in vivo* con la administración de DST.

De los mecanismos del efecto antagónico a la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas.

La descripción de los mecanismos o cambios asociados al efecto paradójico inducido por DST han proporcionado un conjunto de posibles dianas para revertir el efecto antagónico observado en nuestros modelos experimentales.

La inhibición combinada de la tirosina quinasa de EGFR y SRC.

En clínica se han desarrollado dos tipos de estrategias distintas para inhibir el EGFR: los anticuerpos monoclonales como C225 y panitumumab, que bloquean el dominio extracelular del receptor impidiendo la unión del ligando, y los inhibidores tirosina quinasa del EGFR como el AG1478, gefitinib y erlotinib, que bloquean el dominio catalítico del receptor (Harari, 2004). Los inhibidores tirosina quinasa de EGFR inhiben directamente la actividad del dominio catalítico. A diferencia del C225, el inhibidor AG1478 fue extraordinariamente efectivo, hecho que se reflejó en una inhibición muy notable de la fosforilación de ERK1/2 y AKT en nuestros modelos celulares en presencia o ausencia de DST o PP2; cabe señalar que el mayor incremento de ERK1/2 y AKT inducido por DST se dio al estimular EGFR mediante su ligando EGF, lo que sugiere la implicación del propio EGFR en el efecto paradójico del DST (Figura 76A).

Estos resultados sugieren que los tumores que siguen el patrón biológico de las células A431 y FaDu deberían tratarse con inhibidores tirosina quinasa del EGFR en vez de anticuerpos monoclonales. Algunos estudios clínicos realizados con la combinación de dasatinib y erlotinib en NSCLC avanzado (Haura *et al.*, 2010) o con la combinación de AZD0530 (inhibidor de SRC) y gefitinib en tumores malignos asociados con una expresión alterada de EGFR, EGFRvIII y/o SRC (Andersen *et al.*, 2009), avalarían ese concepto.

La inhibición simultánea de JAK y SRC y de JAK, SRC y EGFR.

La activación de STAT3 (vía receptor JAK) se ha descrito como un mecanismo reactivo de resistencia al tratamiento con dasatinib a través del cual las células compensarían la inhibición de SRC (Johnson, Saigal *et al.* 2007; Sen, Saigal *et al.* 2009; Premkumar, Jane *et al.* 2010). Supusimos que este mecanismo podría haber operado en las células A431 y FaDu, pero

la inhibición de JAK/STAT3 con pyridone 6 no fue efectiva para contrarrestar el “exceso” de fosforilación de ERK1/2 y AKT inducida por DST, con lo que se puede descartar este mecanismo de *bypass* o resistencia al dasatinib en estos modelos. Es más, el bloqueo de JAK se asoció a un incremento de actividad del EGFR, al menos a nivel de los puertos de anclaje EGFR pY845 y EGFR pY1068 y a un aumento de función de la quinasa de SRC (Figura 74).

En la literatura los efectos biológicos de la inhibición de JAK/STAT3 han sido muy variables ya que STAT3 puede ser activado por múltiples vías incluyendo EGFR (revisado en Lai y colaboradores (Lai and Johnson 2010)). Se ha observado que la inhibición concomitante de EGFR y SRC reactiva STAT3 a través del receptor JAK (Jaganathan, Yue et al. 2010), de modo que consideramos la posibilidad de que EGFR estuviera jugando un papel en el nuevo antagonismo observado en la inhibición concomitante de SRC y JAK. El tratamiento con C225, DST y P6 en la línea celular FaDu disminuyó la fosforilación de ERK1/2 y AKT inducida por DST indicando la existencia de un mecanismo de cooperación, reactivo, entre estas tres proteínas para compensar el tratamiento con DST. En la línea celular A431, si este mecanismo existe, no fue tan eficiente, dado que a pesar de bloquear EGFR (con C225), JAK y SRC, la fosforilación de ERK1/2 y AKT persistió elevada. Esta “superresistencia” podría estar señalando la existencia de una red compleja de vías de señalización adquiridas durante la carcinogénesis de las células A431 que compensarían con creces los sucesivos bloqueos a los que fueron sometidas (Figura 74).

La inhibición de cMET y SRC.

Recientemente, dos estudios han establecido que la activación sostenida de cMET es una causa de resistencia a DST en el cáncer de cabeza y cuello (Sen *et al.*, 2010) y en líneas celulares de cánceres gástricos (Okamoto *et al.*, 2010). En diversos estudios se ha descrito la interacción entre cMET, EGFR y SRC (Mueller *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009) o entre EGFR y cMET de manera independiente de SRC (Crostella *et al.*, 2001; Lu and Chen, 2011). No obstante, en las células A431 y FaDu, la inhibición simultánea de SRC y MET no sólo no revertió la fosforilación de ERK1/2 y AKT inducidas por DST sino que aún lo aumento más, indicando que la eliminación de cMET potencia el efecto antagónico inducido por la inhibición de SRC (Figura 76B). Este aumento de pERK1/2 y pAKT observado con la inhibición concomitante de cMET y SRC podría estar causado por una regulación al alza de la actividad del EGFR, aunque el control de carga de la tubulina no nos permite afirmar este hecho taxativamente. Estos resultados no apoyarían la investigación clínica combinando dasatinib con anti-cMET (PHA665752).

La inhibición de HER2 y SRC, o HER2, SRC y EGFR.

Se ha descrito la interacción física y subsiguiente cooperación funcional entre los receptores de la familia EGFR. En concreto, las interacciones entre EGFR (HER1) y SRC (Tice *et al.*, 1999) y entre HER2 y SRC (Belsches-Jablonski *et al.*, 2001; Roskoski, 2005; Vadlamudi *et al.*, 2003). Una de las interacciones descritas entre SRC y HER2 consiste en un cambio conformacional centrado en la tirosina 877 de HER2 que se traduce en un aumento de señalización *downstream*. Una de las rutas de señalización activada por la interacción entre SRC y HER2 es la de la proteína STAT3 (Marcotte *et al.*, 2009).

Dados estos antecedentes se decidió inhibir simultáneamente las quinasas SRC y EGFR mediante el tratamiento de las células con DST y AG825, respectivamente. La falta de una respuesta que mostrara un sinergismo entre DST y AG825 (Figura 76C) contrastó con otros resultados en la literatura en los que la combinación de DST y trastuzumab (anticuerpo monoclonal anti-HER2) es activa contra células que sobreexpresan HER2 (Seoane *et al.*, 2010). Se especuló que en las células A431 podría ser necesario bloquear ambos receptores del EGFR, el EGFR y el HER2 (cetuximab no bloquea la dimerización HER2-HER2 (Patel *et al.*, 2009)) a la vez con C225 y AG825 y simultáneamente con DST. El tratamiento triple inhibió significativamente la fosforilación de ERK1/2 y de STAT3 Y705 mientras que en ausencia de AG825 (Figura 76D), DST indujo una elevación de los niveles de ambas fosfoproteínas. Esta observación indica que la interacción entre EGFR, HER2 y SRC participa de la respuesta reactiva frente DST (incremento de la actividad RAS-GTP y subsiguiente fosforilación de ERK, AKT y STAT3), refuerza la idea de que el efecto antagónico inducido por DST se origina en el inicio de la vía de señalización del receptor EGFR y sugiere que tratamientos basados en la inhibición simultánea de EGFR y HER2 (inhibidores de la quinasa de EGFR y HER2, v. gr. lapatinib) combinados con DST podrían abrir nuevas vías de investigación.

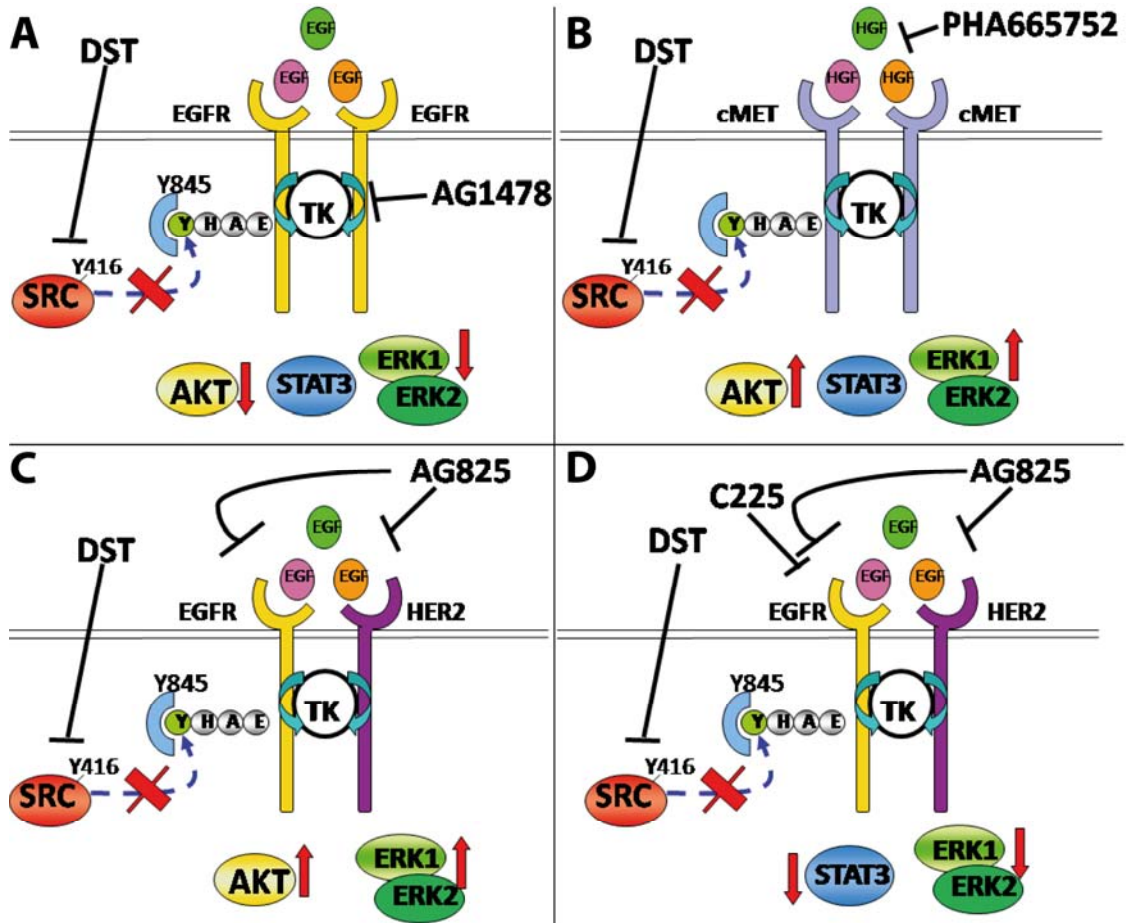


Figura 76. Mecanismos a través de los que DST induce el efecto Warburg. (A) Inhibición de la tirosina quinasa de EGFR y SRC. (B) Inhibición de cMET y SRC. (C) Inhibición de HER2 y SRC. (D) Inhibición de HER2, EGFR y SRC. Abreviaturas: DST, dasatinib; C225, cetuximab; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGF, factor del crecimiento epidérmico; TK, tirosina quinasa; SRC, sarcoma; AKT, proteína quinasa B; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK1/ERK2, quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; cMET, *MNNG HOS Transforming gene*; HGF, factor de crecimiento de los hepatocitos; HER2, receptor del factor de crecimiento epidérmico 2.

Comentario final.

El descubrimiento del efecto antagónico inducido por la combinación de DST con C225 o de DST con radioterapia y C225 en los xenoinplantos de células A431 y FaDu pone de manifiesto la necesidad de ser prudentes en el diseño de estudios clínicos con combinaciones de terapias dirigidas sin un conocimiento preclínico previo. Aunque los fundamentos teóricos pudiesen avalar la combinación de terapias dirigidas contra SRC y EGFR, la realidad de la complejidad de los sistemas biológicos puede resultar en una reacción paradójica que produciría un efecto contrario al que se espera y desea. Los resultados presentados son especialmente relevantes dado el elevado número de ensayos clínicos que exploran actualmente esta combinación o la asociación de DST con otros tratamientos (véase anexo 3 página 189). En este contexto, una idea que merece ser señalada es que el incremento de

ERK1/2 y AKT inducido por DST se observó asociado también al bloqueo de los receptores HER2, cMET y de la quinasa JAK. Esto sugiere que la inhibición concomitante de SRC y de un factor de crecimiento puede dar lugar a una respuesta pro-celular con una acción contraproducente en el tratamiento de estos tumores y que debería ser evaluada minuciosamente (preclínicamente) antes de evaluarse en humanos.

Conclusiones

1. La adición de DST al C225 o al C225 + XRT tuvo un efecto antagónico. Este efecto se caracterizó por:
 - ✓ Un mayor crecimiento de los tumores.
 - ✓ Un incremento de la angiogénesis y de la síntesis de ADN.
 - ✓ Estar asociado a la inhibición de SRC.
 - ✓ Un aumento de la señalización celular que implicó la fosforilación de RAS, ERK1/2, AKT y STAT3.
 - ✓ Una elevación de la secreción de VEGF.
 - ✓ Una hiperactividad del metabolismo glucolítico.

2. Este efecto antagónico sugiere la existencia de un mecanismo de acción reactivo a la inhibición de SRC cuya respuesta biológica se traduce en un aumento de la proliferación celular y del crecimiento tumoral.

3. La funcionalidad de la quinasa del EGFR es una condición necesaria, puesto que, su inhibición por AG1478 (y no por C225) no dio lugar a un antagonismo.

4. El bloqueo simultáneo de SRC y de las quinasas JAK, HER2 o cMET indujo una respuesta reactiva similar a la descrita con C225 que sugiere la implicación de mecanismos de acción, comunes e independientes, de JAK, HER2 y cMET.

5. Por último, este trabajo contribuye a la idea que la combinación de terapias moleculares puede dar lugar a antagonismos, que pueden ponerse de manifiesto durante una investigación preclínica antes de ser evaluados en ensayos clínicos.

Anexos

ANEXO 1. METODOLOGÍA Y ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

1. Experimentos MTT.

En el estudio realizado, las células fueron tratadas con los siguientes fármacos, a partir de sus correspondientes soluciones intermedias de trabajo, y esquemas de tratamiento:

- a) **Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) **Tratamiento con C225:** se preparó una solución de 30 nM de C225 en medio de cultivo y se añadieron 2 mL por pocillo. Los pocillos se incubaron 48 h a 37°C.
- c) **Tratamiento con AG1478:** recuperamos 1'5 mL del medio de cultivo al que añadimos el volumen de fármaco para conseguir una concentración de 100 nM que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C.
- d) **Tratamiento con ligando EGF:** recuperamos 1 mL del medio de cultivo al que añadimos el volumen de ligando para conseguir una concentración de 10 ng/mL que se añadió al cultivo donde se incubó durante 10 min. a 37°C.
- e) **Tratamiento con ligando EGF y C225:** preparamos una solución de 30 nM de C225 de la cual añadimos al cultivo 2 mL por pocillo y la incubamos 48 h a 37°C. Además 10 min. antes de finalizar este periodo de incubación, recuperamos 1 mL del medio de cultivo al que añadimos el volumen de ligando para conseguir una concentración de 10 ng/mL que se añadió al cultivo donde se incubó durante 10 min. también a 37°C.
- f) **Tratamiento con ligando EGF y AG1478:** recuperamos 1'5 mL del medio de cultivo al que añadimos el volumen de fármaco para conseguir una concentración de 100 nM que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C. Además 10 min. antes de finalizar este periodo de incubación, recuperamos 1 mL del medio de cultivo al que añadimos el volumen de ligando para conseguir una concentración de 10 ng/mL que se añadió al cultivo donde se incubó durante 10 min. también a 37°C.
- g) **Tratamiento con DST:** todos los grupos anteriores también fueron combinados con una solución de 150 nM de DST en medio de cultivo de la que se añadieron 2 mL por pocillo. Los pocillos se incubaron 48 h a 37°C.

2. Experimentos de citometría de flujo.

Se sembraron entre 250.000 y 500.000 células por disco en medio completo en discos de 21 cm². Durante 5 días, se dejó que las células se pegaran completamente en el disco y que empezaran a crecer en un incubador a 37°C antes de cambiar el medio completo, después de dos lavados con PBS 1x, por medio sin FBS con los fármacos y devolverlos al incubador donde se mantuvieron durante 48 h. Marcamos las células con C225 conjugado con FITC (previamente preparado en Laboratorios Merck, Dr. Moyano). A continuación, a cada tubo se le añadió 1 mL de tampón de lisis ACK y se centrifugó durante 3 minutos a 1.500 g y a 4°C. Se resuspendieron las células (*pellet*) en solución residual, se añadió formol al 2 % en PBS y se realizó el análisis de citometría de flujo. En el estudio realizado, las células fueron tratadas con los siguientes agentes y siguiendo el esquema de tratamiento mencionado a continuación:

- a) **Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) **Tratamiento con C225:** se preparó una solución de 30 nM de C225 en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.
- c) **Tratamiento con ligando EGF:** recuperamos 2 mL del medio del cultivo al que añadimos el volumen para conseguir una concentración de 10 ng/mL de EGF que se añadió al cultivo donde se incubó durante 30 min a 37°C.
- d) **Tratamiento con DST:** se preparó una solución de 50 nM de DST en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.

Estos tratamientos se combinaron entre ellos.

3. Esquema de tratamiento para los experimentos de crecimiento *in vivo*.

Para los experimentos sin radiación, cuando los tumores llegaron al tamaño adecuado, entre 6-7 mm³, los ratones fueron distribuidos al azar en 4 grupos de tratamiento, A, B, C y D. Los animales fueron tratados siguiendo el esquema de la Figura 77 durante dos semanas, descansando el fin de semana.

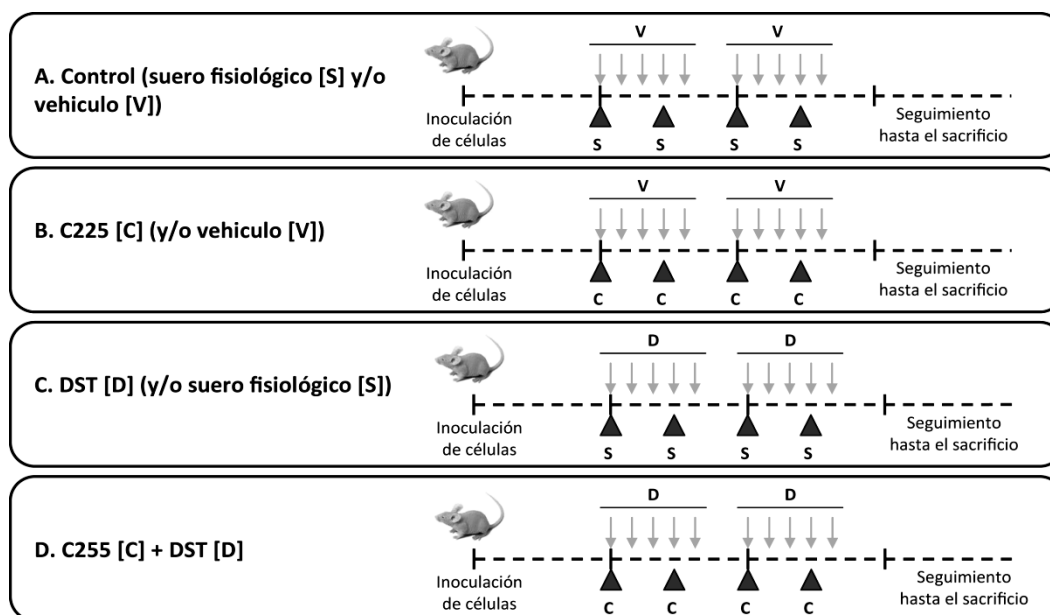


Figura 77. Esquema de los tratamientos *in vivo* para los estudios de crecimiento tumoral sin radiación. Tratamientos: C225 (C) primer día, 1 mg en 200 μ L, resto de días 0'5 mg en 100 μ L, por vía ip. Dasatinib (D) 50 mg/kg en 250 μ L por sonda oral. Suero fisiológico (S) y propanediol (V) se dieron en paralelo como vehículos de C225 y DST, respectivamente, en aquellos animales que no fueron tratados con los fármacos correspondientes. Cada guión de la línea a partir del inicio del tratamiento indica un día, las flechas y los triángulos marcan los días con una dosis de tratamiento. El tratamiento está marcado con la inicial de su nombre.

Los animales usados para determinar del fenotipo de resistencia al C225 fueron tratados siguiendo el esquema de tratamiento descrito en la Figura 78 hasta el momento del sacrificio.

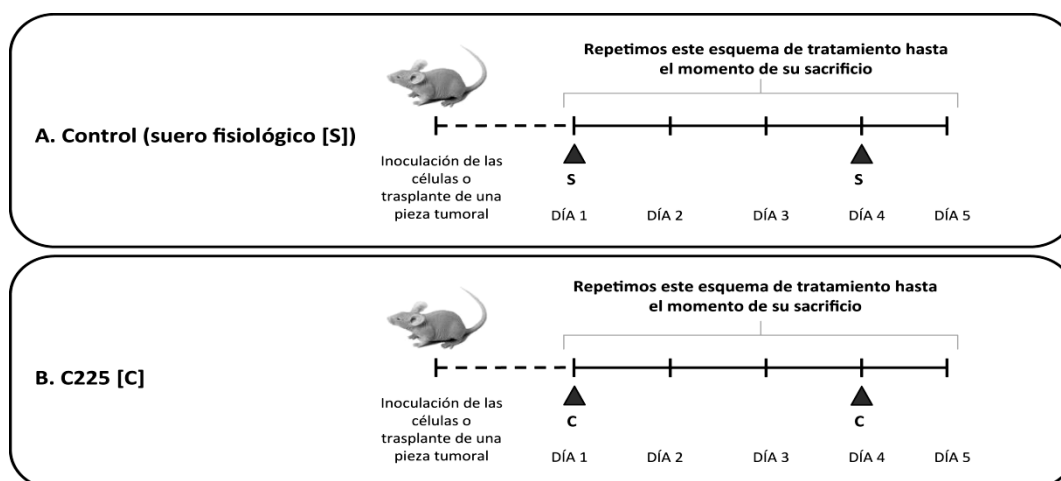


Figura 78. Esquema de tratamiento *in vivo* de los experimentos de caracterización del fenotipo resistente. Después de la generación del tumor, los animales fueron distribuidos al azar para los diferentes tratamientos. La primera dosis de C225 (C) y de suero fisiológico (S) fue doble (1 mg en 200 μ L) para saturar los receptores de EGFR. Los triángulos marcan los días con una dosis de tratamiento. El tratamiento está marcado con la inicial de su nombre.

Para los experimentos de irradiación, cuando los tumores llegaron al tamaño adecuado, entre 6-7 mm³, los ratones fueron distribuidos al azar en 5 grupos, de A a E de tratamiento:

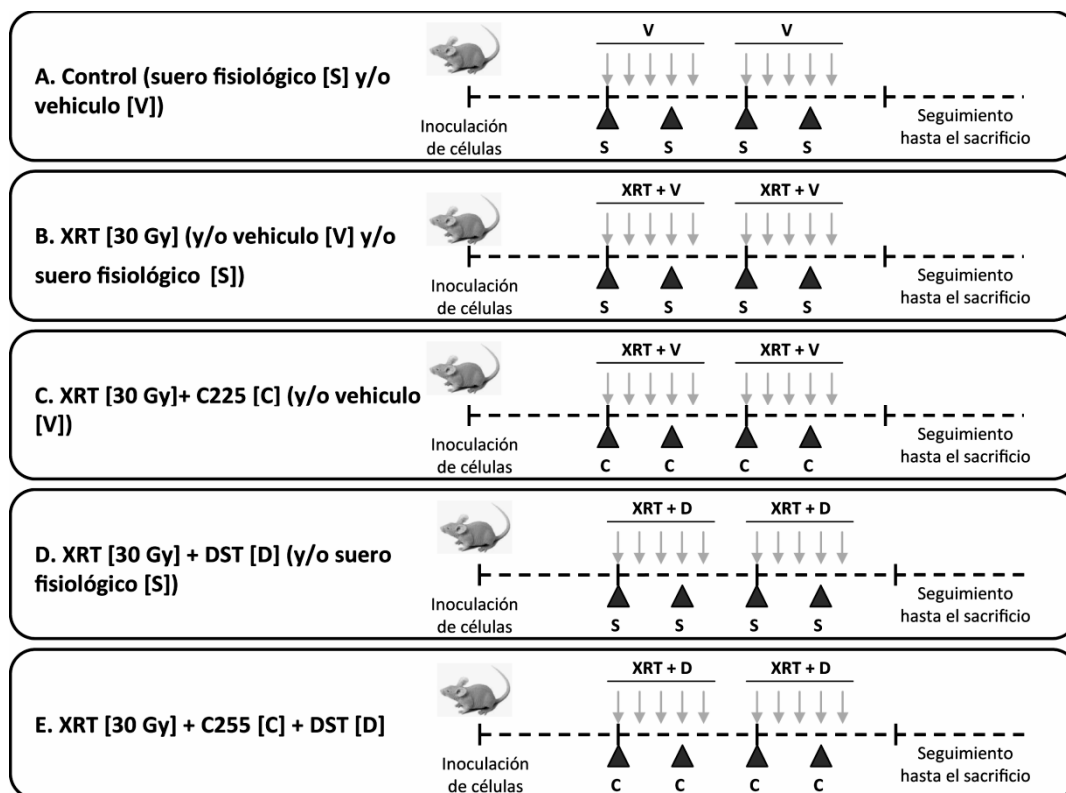


Figura 79. Esquema del tratamiento *in vivo* de los estudios de crecimiento tumoral con radiación. Tratamientos: C225 (C) primer día, 1 mg en 200 µL, resto de días 0'5 mg en 100 µL, por vía ip. Dasatinib (D) 50 mg/kg en 250 µL por sonda oral, 2 horas antes de la radiación. Suero fisiológico (S) y propanediol (V) se dieron en paralelo como vehículos de C225 y DST, respectivamente, en aquellos animales que no fueron tratados con los fármacos correspondientes. XRT corresponde a una dosis de 3 Gy por día (en total 30 Gy). Cada guión de la línea a partir del inicio del tratamiento indica un día, las flechas y los triángulos marcan los días con una dosis de tratamiento. El tratamiento está marcado con la inicial de su nombre.

4. Generación de tumores para estudios de señalización, histología y proteoma.

Cuando los tumores llegaron al tamaño adecuado, entre 5-6 mm³, los ratones fueron distribuidos al azar en 3 grupos de tratamiento, A, B y C.

Los animales fueron tratados siguiendo el esquema de tratamiento de la Figura 80 Se obtuvieron 5 tumores grupo A, y 15 en los grupo B y C.

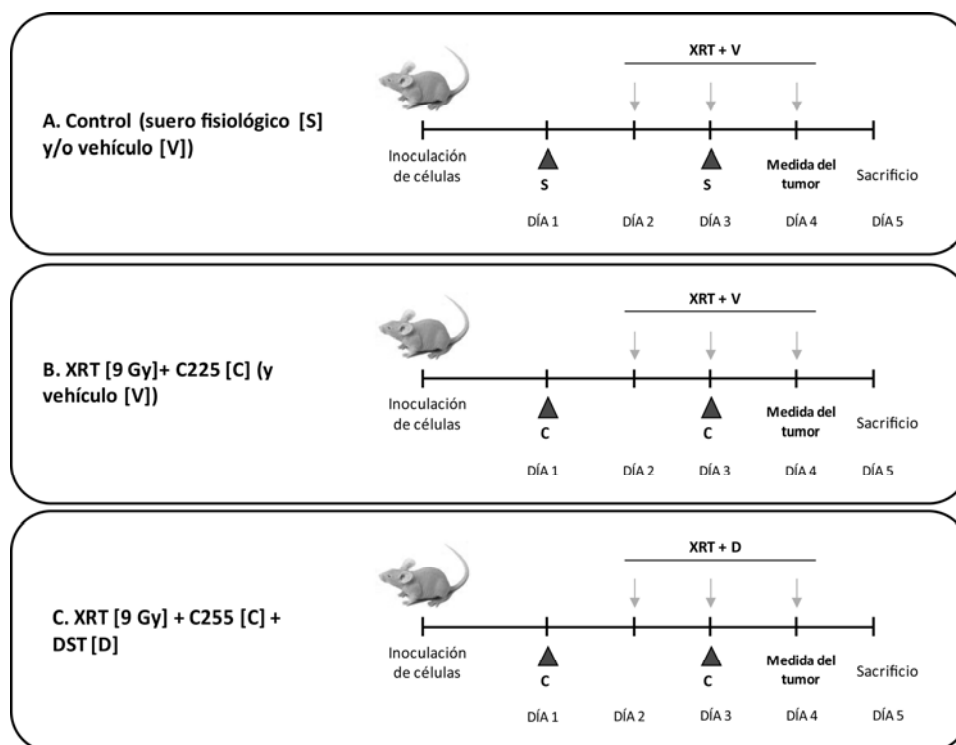


Figure 80. Diagrama del tratamiento *in vivo* para los estudios de de señalización, histología y proteoma. Tratamientos: C225 (C) día 1 y día 3, 1 mg en 200 μ L y 0'5 mg en 100 μ L por vía ip, respectivamente. Dasatinib (D) días, 2, 3 y 4, 50 mg/kg en 250 μ L por sonda oral, 2 horas antes de la radiación. Suero fisiológico (S) y propanediol (V) se dieron en paralelo como vehículos de C225 y DST, respectivamente, en aquellos animales que no fueron tratados con los fármacos correspondientes. XRT corresponde a una dosis de 3 Gy por día (separada 24 h de la siguiente).

5. Tratamientos del cultivo y generación de las muestras *in vitro* para inmunofluorescencia.

Se sembraron 250.000 (experimentos de síntesis de ADN-BrdU) células por disco en medio completo en discos de 21 cm^2 . Durante 5 días, se dejó que las células se pegaran completamente en el disco y que empezaran a crecer en un incubador a 37°C antes de cambiar el medio completo, después de dos lavados con PBS 1x, por medio sin FBS con los fármacos y devolverlos al incubador donde se mantuvieron durante 48 h.

Las células fueron tratadas con los siguientes agentes:

- Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- Tratamiento con C225:** se preparó una solución de 30 nM de C225 en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.
- Tratamiento con DST:** se preparó una solución de 150 nM de DST en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.

Estos tratamientos también se combinaron entre ellos. Las muestras se obtuvieron siguiendo los esquemas de tratamiento que se muestran a continuación (Figura 81):

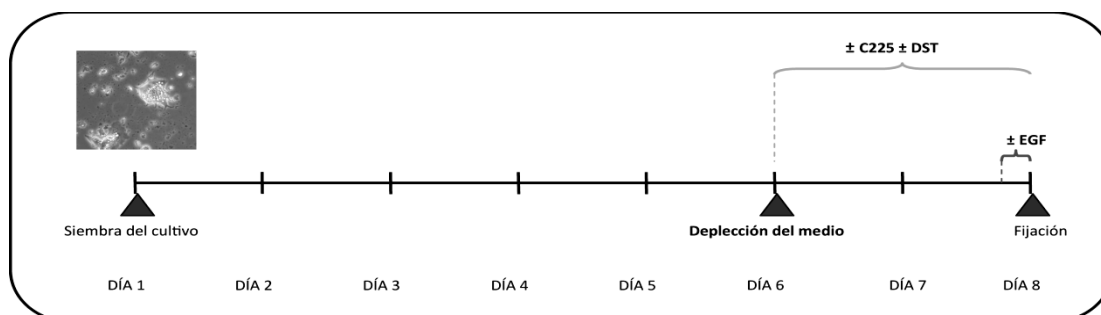


Figure 81. Diagrama del tratamiento de los cultivos para inmunofluorescencia.

6. Estudio Bioquímica, *in vitro*, Western Blot.

En el estudio realizado, las células fueron tratadas con los siguientes agentes y siguiendo la preparación mencionada a continuación:

- a) **Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) **Tratamiento con C225:** se preparó una solución de 30 nM de C225 en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.
- c) **Tratamiento con AG1478:** recuperamos 2'5 mL del medio del cultivo al que añadimos un volumen de fármaco para conseguir una concentración de 100 nM que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C.
- d) **Tratamiento con ligando EGF:** recuperamos 2 mL del medio del cultivo al que añadimos un volumen de ligando para conseguir una concentración de 10 ng/mL que se añadió al cultivo donde se incubó durante 10 min. a 37°C. También se realizaron experimentos de dosis respuesta los cuales se incubaron 5 o 10 ng/mL a distintos tiempos (entre 0 y 30 min.) a 37°C o a distintas concentraciones (entre 0 y 20 ng/mL) durante 10 min. a 37°C.
- e) **Tratamiento con radiación:** en la unidad de radioterapia se sustituyó el medio de los discos por medio precalentado a 37°C, se irradiaron las células, bien oxigenadas, con dosis de 1, 2 o 5 Gy y se incubaron durante 2 o 15 min a 37°C según si buscábamos la respuesta inmediata o tardía en las vías de señalización. Durante la irradiación para mantener el equilibrio electrónico los discos de cultivo

se situaron encima de dos placas de metacrilato (PMMA) de un tamaño de 35 x 35 x 1 (cm).

- f) **Tratamiento con DST:** se preparó una solución de 50 o 150 nM de DST en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 48 h a 37°C.
- g) **Tratamiento con PP2:** se preparó una solución de 5 o 10 μ M de PP2 en medio de cultivo y se añadieron 3 mL por disco. Los discos se incubaron 16 o 48 h a 37°C.
- h) **Tratamiento con AG825:** recuperamos 2'5 mL del medio del cultivo al que añadimos un volumen de fármaco para conseguir una concentración de 0'3, 3, 15 o 30 μ M que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C.
- i) **Tratamiento con P6:** recuperamos 2'5 mL del medio del cultivo al que añadimos un volumen de fármaco para conseguir una concentración de 0'25, 0'5, 1 o 2 μ M que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C.
- j) **Tratamiento con PHA665752:** recuperamos 2'5 mL del medio del cultivo al que añadimos un volumen de fármaco para conseguir una concentración de 100, 500 o 1500 nM que se añadió al cultivo donde se incubó durante 2 h a 37°C.

Estos tratamientos se combinaron entre ellos. De modo que cuando un tratamiento con un tiempo de incubación largo (48 h) se combinaba con otro tratamiento con un tiempo de incubación menor, excepto con PP2 (16 h) y radiación, se recuperaba un volumen de medio en que se añadiría la cantidad de fármaco necesaria para conseguir la concentración deseada. Esta recuperación de medio se realizó para preservar los factores de crecimiento secretados al medio como consecuencia de la administración de un fármaco, los cuales podrían ser importantes para la acción del fármaco con el que se combina y para la evaluación los cambios inducidos por los tratamientos en las vías de señalización. Los lisados se realizaron siguiendo el esquema de tratamiento que se muestra a continuación (Figura 82).

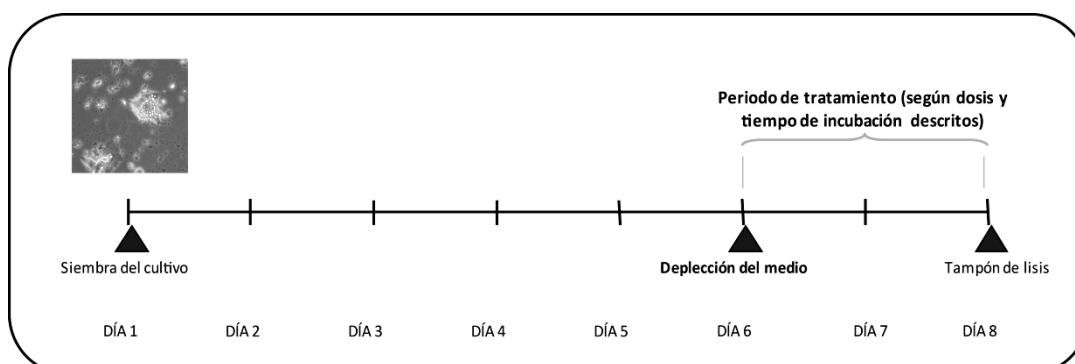


Figure 82. Diagrama del tratamiento de los cultivos para western blot.

7. Esquema tratamiento para determinación de VEGF.

Las células se expusieron a los siguientes tratamientos durante 0, 24 o 48 h:

- a) **Condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) **C225:** añadimos al medio un volumen de C225 para obtener una concentración en el cultivo de 30 nM.
- c) **Radiación:** irradiamos el cultivo con una única dosis de 8 Gy.
- d) **DST:** añadimos al medio un volumen de DST para obtener una concentración en el cultivo de 150 nM.
- e) **C225 y DST:** añadimos al medio un volumen de C225 y de DST para obtener una concentración en el cultivo de 30 nM y de 150 nM, respectivamente.
- f) **XRT y C225:** irradiamos el cultivo con una única dosis de 8 Gy y añadimos al medio un volumen de C225 para obtener una concentración en el cultivo de 30 nM.
- g) **XRT y DST:** irradiamos el cultivo con una única dosis de 8 Gy y añadimos al medio un volumen de DST para obtener una concentración en el cultivo de 150 nM.
- h) **XRT, C225 y DST:** irradiamos el cultivo con una única dosis de 8 Gy y añadimos al medio un volumen de C225 y de DST para obtener una concentración en el cultivo de 30 nM y de 150 nM, respectivamente.

8. Experimentos de actividad de RAS.

En el estudio realizado, las células fueron tratadas con los siguientes fármacos y siguiendo el esquema de tratamiento mencionado a continuación:

- a) **Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) **Tratamiento con ligando EGF:** recuperamos 2 mL del medio de cultivo y añadimos un volumen de ligando para conseguir un medio con una concentración de 10 ng/mL el cual se añadió al cultivo y se incubó durante 10 min. a 37°C.
- c) **Tratamiento con ligando EGF y C225:** preparamos un medio al cual añadimos un volumen de C225 para obtener una concentración de 30 nM, lo añadimos al cultivo durante 48 h a 37°C. Además 10 min. antes de finalizar la incubación, recuperamos 2 mL del medio de cultivo y añadimos un volumen de ligando para conseguir un medio con una concentración de 10 ng/mL el cual se añadió al cultivo y se incubó durante 10 min. a 37°C.

- d) Tratamiento con DST:** todos los grupos mencionados anteriormente también se combinaron con DST preparando un medio al cual añadimos un volumen de DST para obtener una concentración de 150 nM la cual incubamos en el cultivo durante 48 h a 37°C.

9. Experimentos de LDH.

En el estudio que realizamos, las células fueron tratadas con los siguientes fármacos y siguiendo este esquema de tratamiento:

- a) Tratamiento en condiciones basales:** las células se expusieron a los vehículos de los fármacos.
- b) Tratamiento con ligando EGF:** recuperamos 2 mL del medio de cultivo y añadimos un volumen de ligando para conseguir un medio con una concentración de 10 ng/mL el cual se añadió al cultivo y se incubó durante 10 min. a 37°C.
- c) Tratamiento con ligando EGF y C225:** preparamos un medio al cual añadimos un volumen de C225 para obtener una concentración de 30 nM, lo añadimos al cultivo durante 48 h. Además 10 min. antes de finalizar la incubación, recuperamos 2 mL del medio de cultivo y añadimos un volumen de ligando para conseguir un medio con una concentración de 10 ng/mL el cual se añadió al cultivo y se incubó durante 10 min. a 37°C.
- d) Tratamiento con DST:** todos los grupos mencionados anteriormente también se combinaron con DST preparando un medio al cual añadimos un volumen de DST para obtener una concentración de 150 nM y lo incubamos en el cultivo durante 48 h a 37°C.

ANEXO 2: Cambios en las vías de señalización inducidos por PP2.

1. Cambios inducidos por el PP2 en las proteínas EGFR, SRC, STAT3 y ERK1/2.

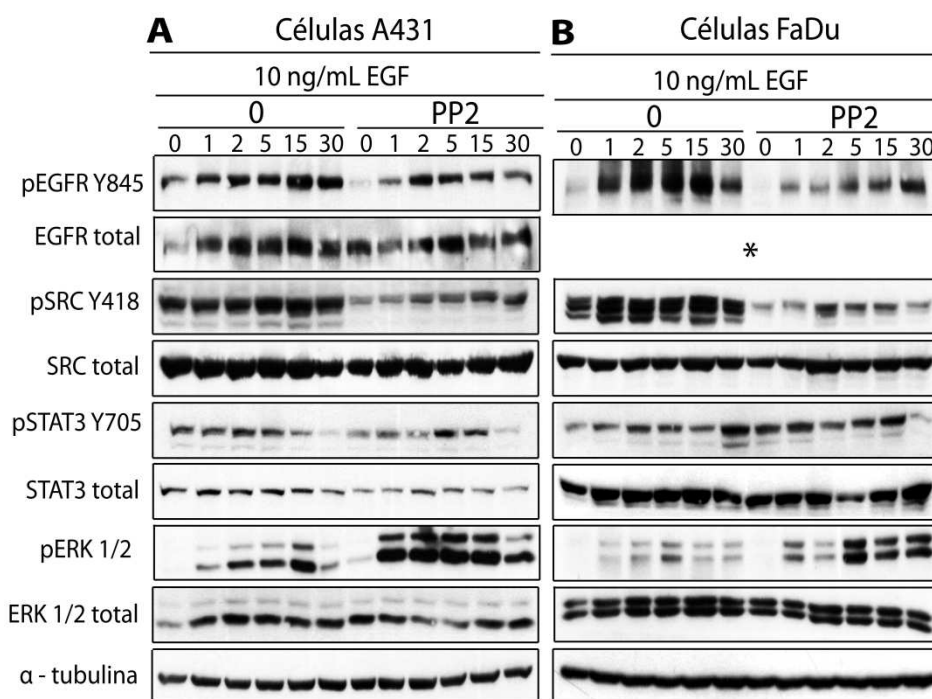


Figura 83. Efecto de la inhibición de SRC en las vías de señalización. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF en presencia o ausencia de PP2 analizados por WB. Las células se lisaron después de cada incubación con ligando. EGF, 10 ng/mL de 0 a 30 min. PP2, 10 μ M durante 48 h. Se realizaron 2 lisados independientes, por duplicado y por línea. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados.

2. Cambios inducidos por PP2, cetuximab y AG1478 sobre SRC, EGFR, AKT, ERK1/2 y STAT3.

2.1. Cambios inducidos por PP2 en combinación con C225 o AG1478 en la proteína SRC.

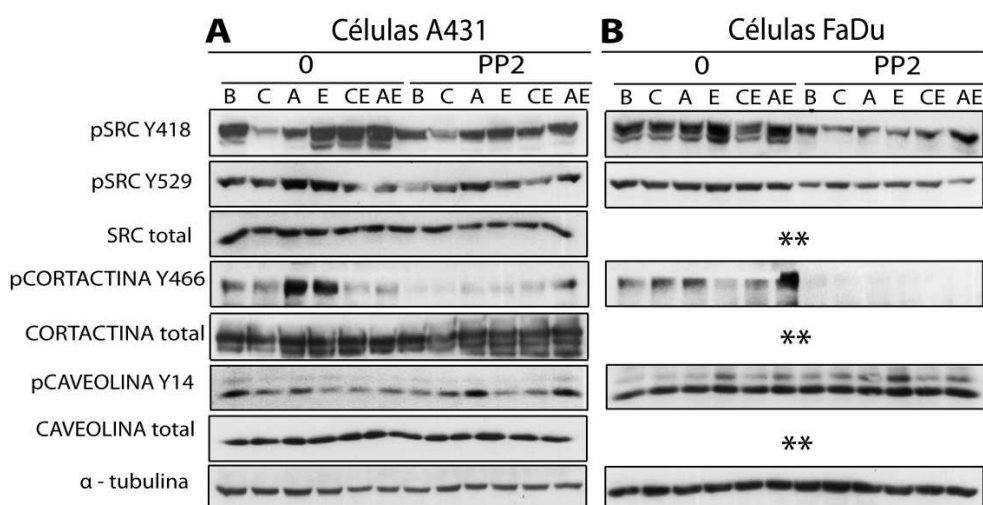


Figura 84. La inhibición concomitante de EGFR y SRC induce cambios en la regulación de SRC y de la Cortactina. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF, C225 o AG1478 en presencia o ausencia de PP2 analizados por WB. B, vehículo; C, C225 30 nM durante 48 h; E, EGF 10 ng/mL durante

10 min.; A, AG1478 100nM durante 2 h; PP2, 10 μ M durante 48 h. Se realizaron 2 lisados independientes, por duplicado y por línea. **No se realizaron estas proteínas.

2.2. Cambios inducidos por PP2 en combinación con C225 y AG1478 en la proteína EGFR.

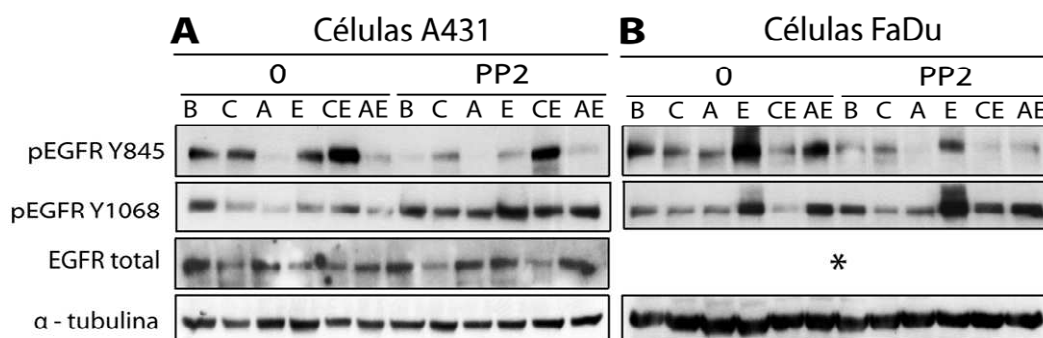


Figura 85. La inhibición concomitante de EGFR y SRC induce cambios en la proteína EGFR. Igual que la Figura 84 pero para las proteínas indicadas. *No se consiguió obtener esta proteína.

2.3. Cambios inducidos por PP2 en combinación con C225 y AG1478 en las proteínas AKT y ERK.

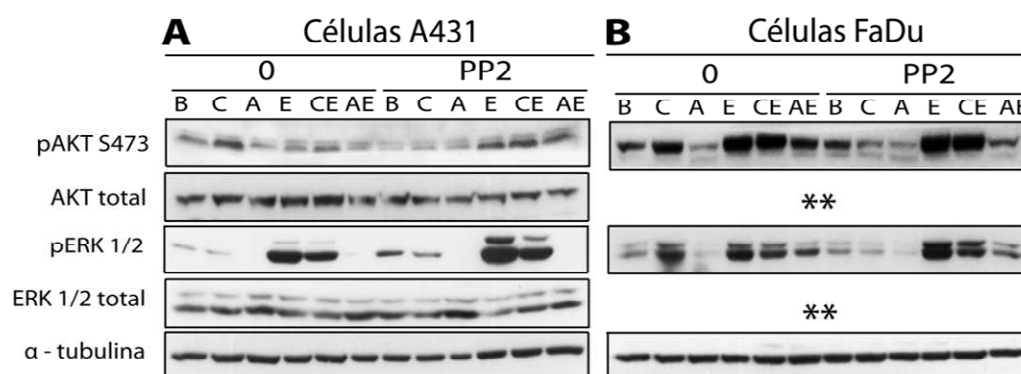


Figura 86. La inhibición concomitante de EGFR y SRC induce cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 84 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

2.4. Cambios inducidos por PP2 en combinación con C225 y AG1478 en la proteína STAT3.

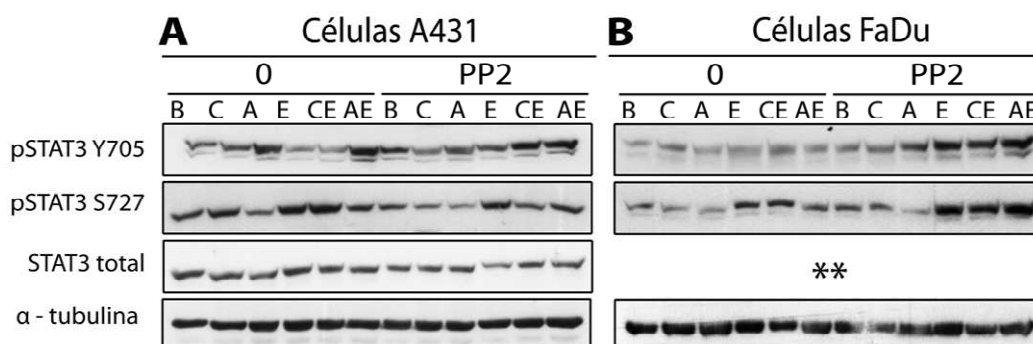


Figura 87. La inhibición concomitante de EGFR y SRC induce cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 84 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

3. Efecto del PP2 en combinación con un inhibidor de JAK.

3.1. La administración del inhibidor de JAK no revierte el efecto paradójico inducido por PP2.

A nivel del EGFR:

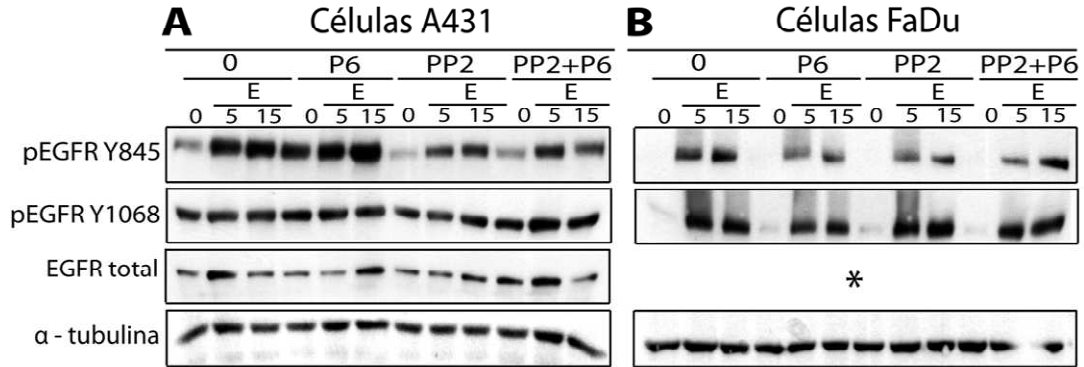


Figura 88. La inhibición concomitante de JAK y SRC induce cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con P6, EGF, PP2 analizados por WB. P6, Pyridone 6 0'25 μ M durante 2 h; E, EGF 10 ng/mL durante 0, 5 o 15 min.; PP2, 10 μ M durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína.

A nivel de SRC:

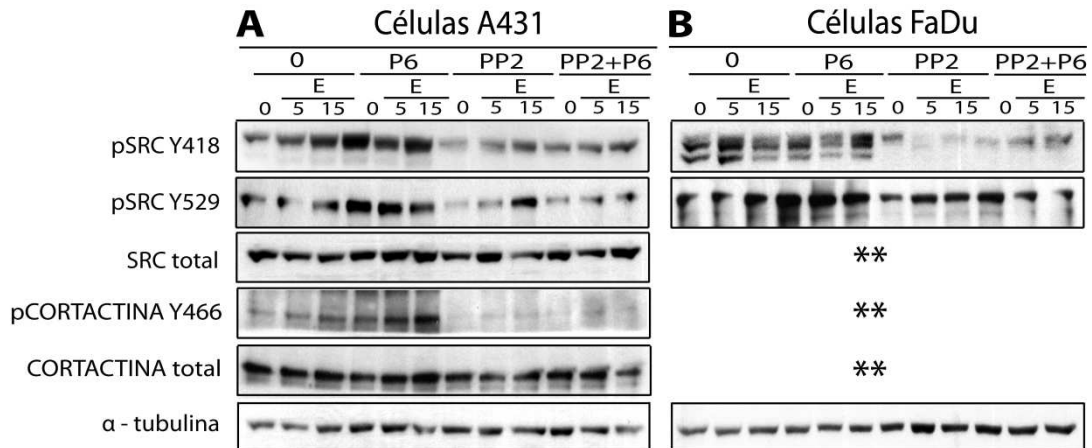


Figura 89. La inhibición concomitante de JAK y SRC induce cambios en la regulación de SRC y Cortactina. Igual que la Figura 88 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

A nivel de STAT3:

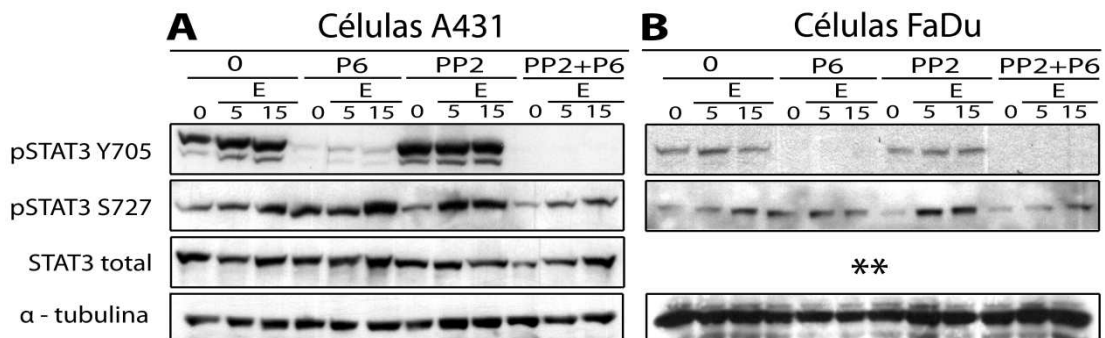


Figura 90. La inhibición concomitante de JAK y SRC induce cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 88 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

A nivel de ERK y AKT:

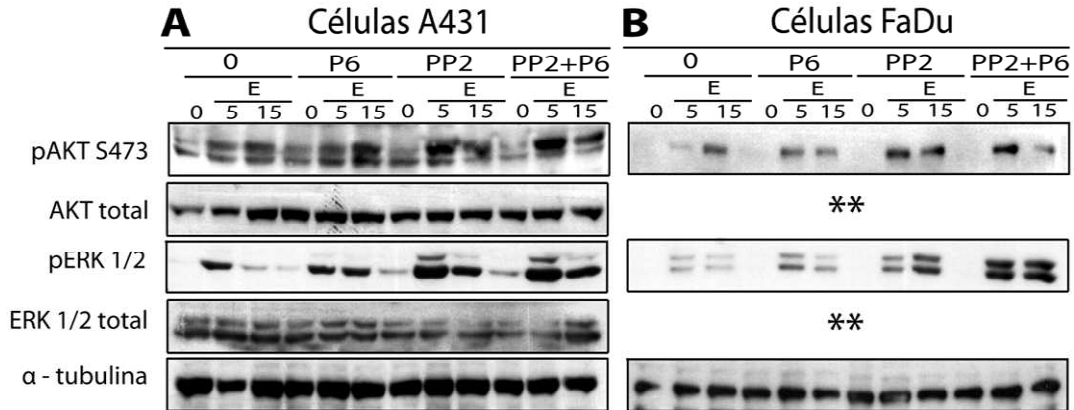


Figura 91. La inhibición concomitante de EGFR y SRC induce cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 88 pero para las proteínas indicadas. **No se realizaron estas proteínas.

3.2. El Pyridone 6 no revierte el efecto paradójico producido por C225 y DST.

A nivel del EGFR:

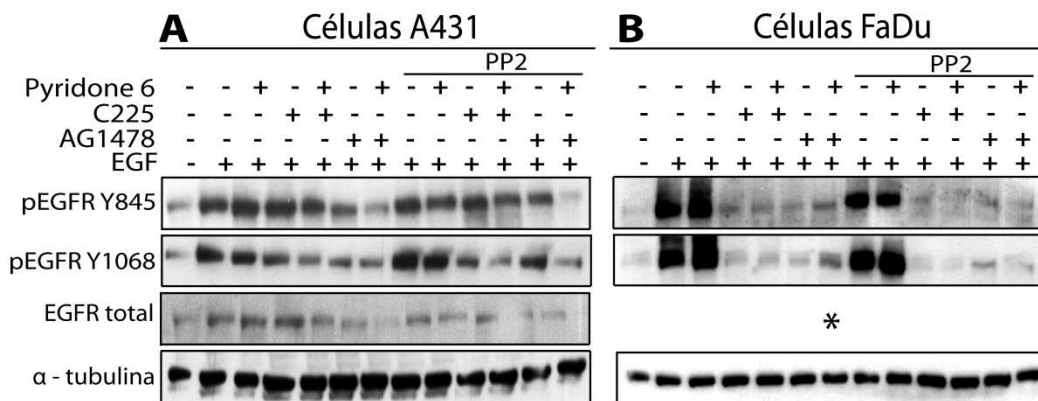


Figura 92. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC induce cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con P6, EGF, C225 o AG1478 en presencia o ausencia de PP2 analizados por WB. Pyridone 6, 0'25 μ M durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; C225, 30 nM durante 48 h; AG1478, 100 nM durante 2 h; PP2, 10 μ M durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína.

A nivel de SRC:

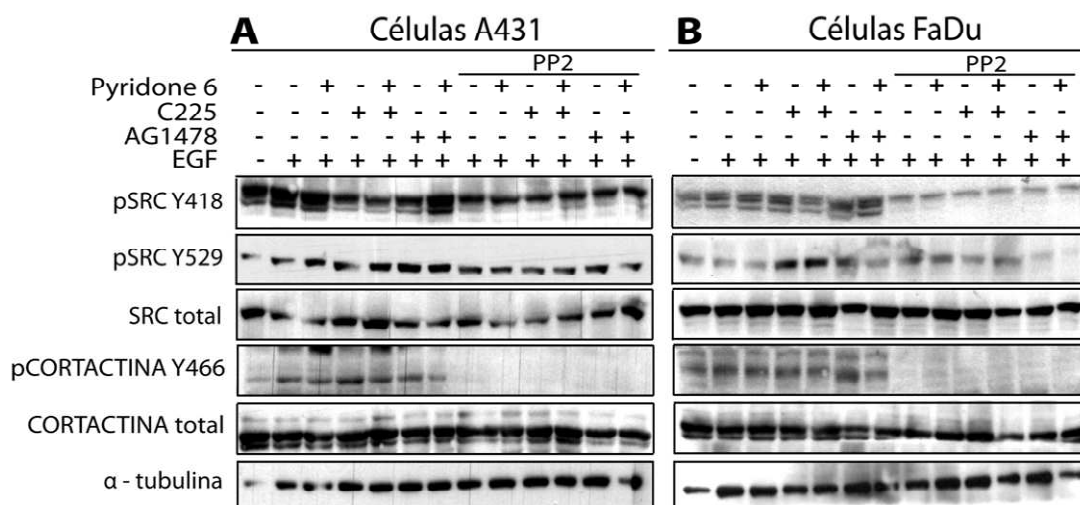


Figura 93. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC induce cambios en la regulación de SRC y Cortactina. Igual que la Figura 92 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de STAT3:

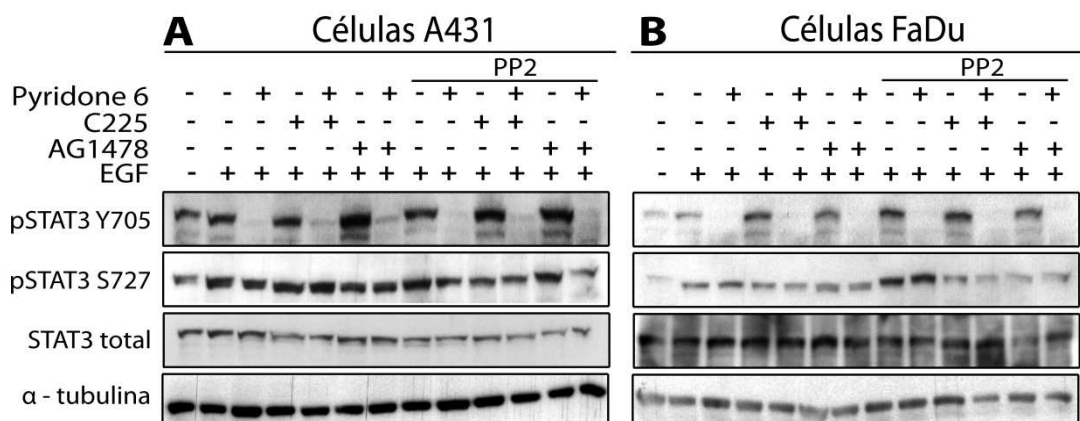


Figura 94. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC induce cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 92 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de ERK y AKT:

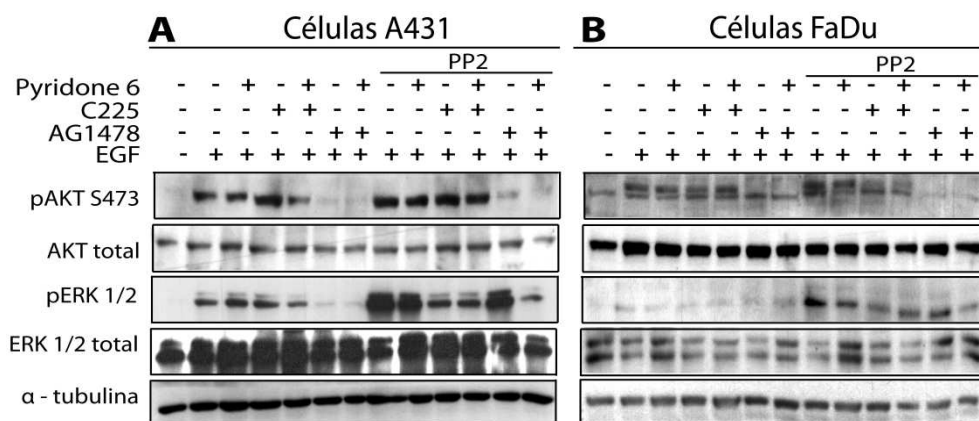


Figura 95. La inhibición concomitante de JAK, EGFR y SRC induce cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 92 pero para las proteínas indicadas.

4. Efecto de la inhibición de SRC en combinación con un inhibidor de cMET.

4.1. La administración del inhibidor de cMET no revierte el efecto paradójico del PP2.

A nivel de EGFR:

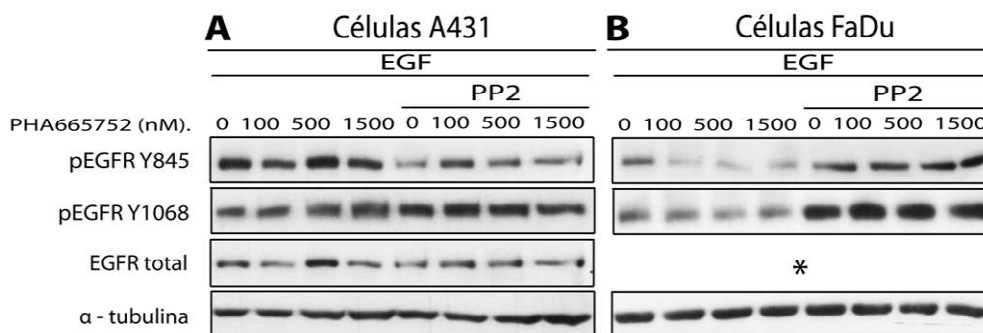


Figura 96. La inhibición concomitante de cMET y SRC induce cambios en la proteína EGFR. Lisados de células A431 (A) y FaDu (B) tratadas con EGF y PHA6645752 en presencia o ausencia de PP2 analizados por WB. PHA665752, 100, 500 y 1500 nM durante 2 h; EGF, 10 ng/mL durante 10 min.; PP2, 10 μM durante 48 h. Se realizó un 1 lisado, por duplicado y por línea celular. *No se consiguió obtener esta proteína en los lisados de la línea celular FaDu.

A nivel de SRC:

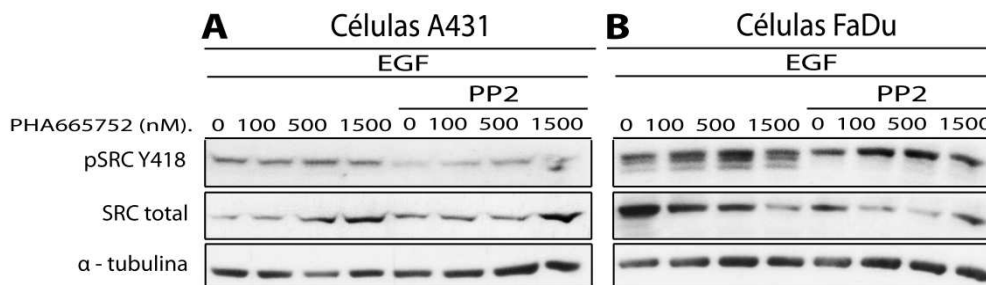


Figura 97. La inhibición concomitante de cMET y SRC induce cambios en la regulación de SRC y de la Cortactina. Igual que la Figura 96 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de STAT3:

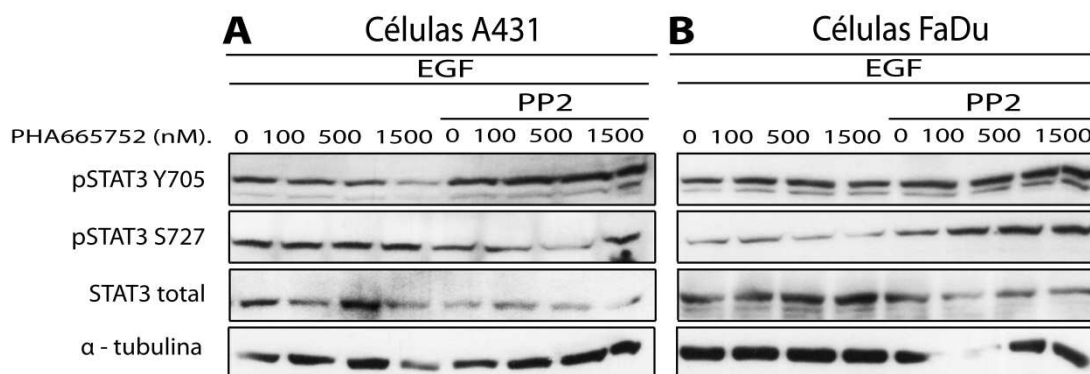


Figura 98. La inhibición concomitante de cMET y SRC induce cambios en la proteína STAT3. Igual que la Figura 96 pero para las proteínas indicadas.

A nivel de ERK y AKT:

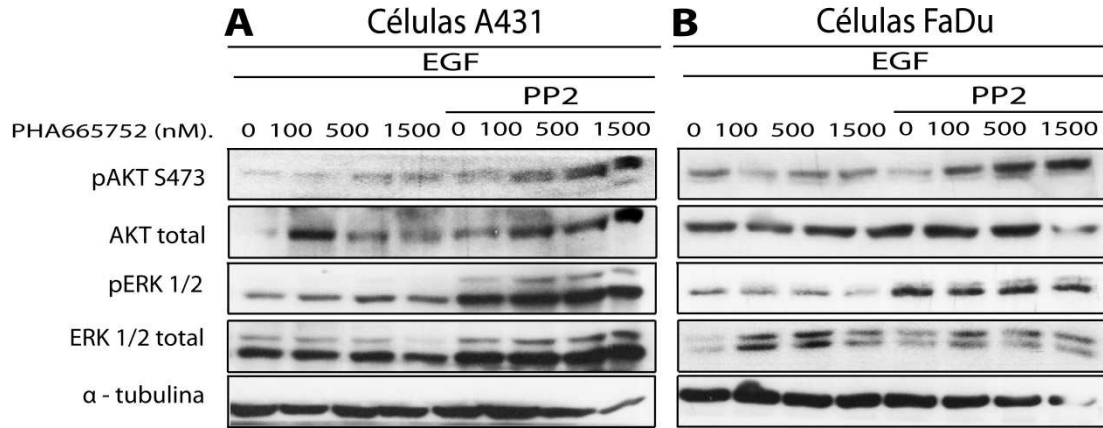


Figura 99. La inhibición concomitante de cMET y SRC induce cambios en las proteínas ERK y AKT. Igual que la Figura 96 pero para las proteínas indicadas.

ANEXO 3. ENSAYOS CLINICOS CON DASATINIB

Tipo de tumor	Fase	Dosis DST seleccionadas para fase II	Agentes en combinación	Resultados	Ensayo clínico
Cáncer de mama ER+	II	100 mg diarios	Letrozole	En curso	NCT00696072
Cáncer de mama ER+	I-II	70 mg diarios	Fulvestrant y un anticuerpo contra IGF-1R MK-0646	En curso	NCT00903006
Cáncer de mama avanzado ER+	II	100 mg diarios	Exemestane	En curso	NCT00767520
Cáncer de mama ER+ o HER2+	II	70 o 100 mg dos veces/día	-	RECIST(69): 3(4) PR, 6(9) SD	NCT00371345
Cáncer de mama HER2+	I-II	-	Paclitaxel y trastuzumab	En curso	NCT01306942
Cáncer de mama sin selección	I	100 mg diarios	Capecitabine	PR 13.5%	NCT00452673
Cáncer de mama sin selección	I-II	120 mg diarios	Paclitaxel	PR 25%	NCT00820170
Cáncer de mama localmente avanzado, triple negativo	II	70 o 100 mg dos veces/día	-	RECIST(43): 2(5) PR, 2(5) SD	NCT00371254
Cáncer de mama localmente avanzado, triple negativo	II	100 mg diarios	-	Finalizado por futilidad después de un análisis interino	NCT00817531
Cáncer de mama avanzado	II	100 mg diarios	Fulvestrant	En curso	NCT00754325
Cáncer de mama avanzado	II	50, 70 o 100 mg dos veces/día	-	Ensayo suspendido en las primeras etapas con 31 pacientes por superar el límite estadístico de al menos 4 (13 %) pacientes sin PD para continuar con el reclutamiento	NCT00546104
Cáncer de mama metastático	II	100 mg diarios	-	En curso	NCT00780676
Cáncer de mama con metástasis ósea	II	-	-	En curso	NCT00410813
Cáncer de próstata sin quimioterapia previa CRPC	I-II	100 mg diarios	Docetaxel	PR 42%	NCT00439270
Cáncer de próstata sin quimioterapia previa CRPC	III	100 mg diarios	Prednisone + docetaxel	En curso	NCT00744497
CRPC	II	70 o 100 mg dos veces/día /100 mg diarios	-	RECIST(24): 12(50) SD	NCT00385580
CRPC	II	150 mg diarios	-	RECIST(31): 13(42) PR, 3(10) uPR, 5(16) SD	NCT00570700
CRPC metastático	II	100 mg diarios	Nilutamide	Terminado por decisión del IP	NCT00918385
Melanoma	II	100 mg diarios	-	En curso	NCT01092728
Melanoma	II	70 mg dos veces/día	-	PR 5%	NCT00436605
Melanoma – localmente avanzado/metastático	II	-	-	En curso	NCT00700882
Melanoma avanzado	I-II	100 mg diarios	Dacarbazine	PR 8.2%, beneficio clínico 59.2%	NCT00597038
Cáncer de pulmón –	II	70 o 100 mg dos	-	NR y PR 0%	NCT00570401

Anexos

avanzado		veces/día /100 mg diarios			
NSCLC	II	70 mg dos veces/día	-	En curso	NCT00787267
NSCLC	II	140 mg diarios	-	Reclutamiento lento (7; 2 completados, 5 no completados: 1 retirado 3 muertos y 1 PD)	NCT00858403
NSCLC	I-II	70 mg diarios	Erlotinib	En curso	NCT00826449
NSCLC – recurrente	II	100 mg AM y 50 mg PM	-	En curso	NCT00459342
SCLC	II	70 mg dos veces/día	-	PD 65%, SD 16%, evaluación inadecuada 19%	NCT00470054
CRC	I	100 mg diarios	5-FU, Cetuximab, leucovorin y oxaliplatin	En curso	NCT00501410
CRC	I-II	-	Bevacizumab, capecitabine y oxiplatine	En curso	NCT00920868
CRC	I	-	Cetuximab	En curso	NCT00835679
CRC metastático	II	-	-	SD 5%, falta de respuesta	NCT00504153
HNC	II	150 mg diarios	Cetuximab	En curso	NTC01488318
HNC	I-II	-	Cetuximab	En curso	NCT00882583
Tumores sólidos avanzados	I	100 mg, 150 mg o 200 mg	Cetuximab	En curso	NTC00388427
Cánceres avanzados	I	-	Erlotinib Clorhidrato (Tarceva)	En curso	NTC00903734
GBM/gliosarcoma	I-II	100 mg diarios o dos veces/día	Lomustine	Incapacidad para cumplir los objetivos del protocolo	NCT00948389
GBM/gliosarcoma	II	-	-	Suspendido	NCT00423735
GIST	II	-	-	En curso	NCT00568750
Cáncer hepático avanzado	II	-	-	Terminado	NCT00459108
Mesotelioma – recurrente	II	50 mg dos veces/día	-	En curso	NCT00509041
Cáncer de ovario / trompas de Falopio / peritoneal – recurrente	II	-	-	Completado	NCT00671788
Cáncer pancreático	II	-	-	En curso	NCT00544908
Cáncer pancreático metastático	II	-	-	En curso	NCT00474812
Cáncer de la glándula salivar – recurrente / metastático	II	-	-	En curso	NCT00859937
Sarcoma - avanzado	II	-	-	En curso	NCT00464620

PR: Respuesta parcial, uPR: PR no confirmada, SD: Enfermedad estable, NR: Sin respuesta, PD: Enfermedad progresiva, CRPC: Cáncer de próstata resistente a la castración, HR+: Receptor de la hormona - positivo, HER2+: Receptor del factor epidérmico humano-2 positivo, ER+: Receptor del estrógeno-positivo, NSCLC: Carcinoma de pulmón de célula no pequeña, HNC: Cabeza y cuello, CRC: Cáncer colorrectal, SCLC: Carcinoma de pulmón de célula pequeña, IP: Investigador principal.

Referencias

Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer (2006). *Cancer Biol Ther* **5**: 340-2.

Ahsan A, Hiniker SM, Davis MA, Lawrence TS, Nyati MK (2009). Role of cell cycle in epidermal growth factor receptor inhibitor-mediated radiosensitization. *Cancer Res* **69**: 5108-14.

Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L (1999). Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* **5**: 2884-90.

Amit I, Wides R, Yarden Y (2007). Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol* **3**: 151.

Andersen P, Villingshoj M, Poulsen HS, Stockhausen MT (2009). Improved response by co-targeting EGFR/EGFRvIII and Src family kinases in human cancer cells. *Cancer Invest* **27**: 178-83.

Ang KK, Andratschke NH, Milas L (2004). Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 959-65.

Araujo J, Logothetis C (2010). Dasatinib: A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev*.

Baro M, de Llobet LI, Modolell I, Guedea F, Visa J, Balart J (2012). Development and refinement of a technique using a medical radiation therapy facility to irradiate immunodeficient mice bearing xenografted human tumours. *Lab Anim*.

Belsches-Jablonski AP, Biscardi JS, Peavy DR, Tice DA, Romney DA, Parsons SJ (2001). Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene* **20**: 1465-75.

Benavente S, Huang S, Armstrong EA, Chi A, Hsu KT, Wheeler DL *et al* (2009). Establishment and characterization of a model of acquired resistance to epidermal growth factor receptor targeting agents in human cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**: 1585-92.

Bianco R, Damiano V, Gelardi T, Daniele G, Ciardiello F, Tortora G (2007). Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des* **13**: 3358-67.

Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* **274**: 8335-43.

Blumenschein GR, Jr., Mills GB, Gonzalez-Angulo AM (2012). Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol* **30**: 3287-96.

Boerner JL, Biscardi JS, Silva CM, Parsons SJ (2005). Transactivating agonists of the EGF receptor require Tyr 845 phosphorylation for induction of DNA synthesis. *Mol Carcinog* **44**: 262-73.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB *et al* (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354**: 567-78.

- Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K *et al* (2001). The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* **20**: 1388-97.
- Bradford HN, Dela Cadena RA, Kunapuli SP, Dong JF, Lopez JA, Colman RW (1997). Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* **90**: 1508-15.
- Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem* **272**: 1368-76.
- Byers LA, Sen B, Saigal B, Diao L, Wang J, Nanjundan M *et al* (2009). Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 6852-61.
- Caccia D, Micciche F, Cassinelli G, Mondellini P, Casalini P, Bongarzone I (2010). Dasatinib reduces FAK phosphorylation increasing the effects of RPI-1 inhibition in a RET/PTC1-expressing cell line. *Mol Cancer* **9**: 278.
- Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM (2005). Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* **11**: 397-405.
- Ciardello F, Tortora G (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* **358**: 1160-74.
- Congleton J, MacDonald R, Yen A (2011). Src inhibitors, PP2 and dasatinib, increase retinoic acid-induced association of Lyn and c-Raf (S259) and enhance MAPK-dependent differentiation of myeloid leukemia cells. *Leukemia* **26**: 1180-8.
- Contessa JN, Abell A, Valerie K, Lin PS, Schmidt-Ullrich RK (2006). ErbB receptor tyrosine kinase network inhibition radiosensitizes carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**: 851-8.
- Courtneidge SA (2002). Role of Src in signal transduction pathways. The Jubilee Lecture. *Biochem Soc Trans* **30**: 11-7.
- Crostella L, Lidder S, Williams R, Skouteris GG (2001). Hepatocyte Growth Factor/scatter factor-induces phosphorylation of cortactin in A431 cells in a Src kinase-independent manner. *Oncogene* **20**: 3735-45.
- Chen CC, Chen WC, Lu CH, Wang WH, Lin PY, Lee KD *et al* (2010). Significance of interleukin-6 signaling in the resistance of pharyngeal cancer to irradiation and the epidermal growth factor receptor inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**: 1214-24.
- de Llobet LI, Baro M, Figueras A, Modolell I, Da Silva MV, Munoz P *et al* (2012). Development and characterization of an isogenic cell line with a radioresistant phenotype. *Clin Transl Oncol*.
- de Rooij J, Bos JL (1997). Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* **14**: 623-5.

Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L *et al* (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **280**: 31182-9.

Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP (2008). Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol Cancer* **7**: 69.

Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rothmund MC, Peter Rodemann H (2009a). Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport. *Radiother Oncol* **92**: 379-82.

Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2009b). Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol* **186**: 1-6.

Dunn EF, Iida M, Myers RA, Campbell DA, Hintz KA, Armstrong EA *et al* (2010). Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene*.

Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL *et al* (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* **39**: 171-83.

Egloff AM, Grandis JR (2011). Response to combined molecular targeting: defining the role of P-STAT3. *Clin Cancer Res* **17**: 393-5.

El-Shewy HM, Lee MH, Obeid LM, Jaffa AA, Luttrell LM (2007). The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* **282**: 26150-7.

Elsberger B, Tan BA, Mallon EA, Brunton VG, Edwards J (2010). Is there an association with phosphorylation and dephosphorylation of Src kinase at tyrosine 530 and breast cancer patient disease-specific survival. *Br J Cancer* **103**: 1831-4.

GG S (1987). How well do xenografts maintain the therapeutic response characteristics of the source tumor in the donor patient? In: Kallan RF, ed,; *Rodent tumors in experimental cancer therapy*, New York, Pergamon, 1987.

Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, Sartor CI, Cox AD (2002). Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways. *Cancer Res* **62**: 4142-50.

Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S *et al* (2000). Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4227-32.

Gratacap MP, Martin V, Valera MC, Allart S, Garcia C, Sie P *et al* (2009). The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood* **114**: 1884-92.

Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S *et al* (2008). Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* **118**: 2609-19.

- Haffty BG, Glazer PM (2003). Molecular markers in clinical radiation oncology. *Oncogene* **22**: 5915-25.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74.
- Harari PM (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* **11**: 689-708.
- Harrison SC (2003). Variation on an Src-like theme. *Cell* **112**: 737-40.
- Haura EB, Tanvetyanon T, Chiappori A, Williams C, Simon G, Antonia S *et al* (2010). Phase I/II study of the Src inhibitor dasatinib in combination with erlotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**: 1387-94.
- Herling A, Konig M, Bulik S, Holzthutter HG (2011). Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *Febs J* **278**: 2436-59.
- Huang S, Benavente S, Armstrong EA, Li C, Wheeler DL, Harari PM (2011). p53 modulates acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res* **71**: 7071-9.
- Israel M, Schwartz L (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer* **10**: 70.
- Jaganathan S, Yue P, Turkson J (2010). Enhanced sensitivity of pancreatic cancer cells to concurrent inhibition of aberrant Stat3 and EGFR or Src. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G (2003). Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res* **9**: 2316-26.
- Johnson FM, Saigal B, Tran H, Donato NJ (2007). Abrogation of signal transducer and activator of transcription 3 reactivation after Src kinase inhibition results in synergistic antitumor effects. *Clin Cancer Res* **13**: 4233-44.
- Johnson ML, Riely GJ, Rizvi NA, Azzoli CG, Kris MG, Sima CS *et al* (2011). Phase II trial of dasatinib for patients with acquired resistance to treatment with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors erlotinib or gefitinib. *J Thorac Oncol* **6**: 1128-31.
- Josep Balart MB, Lara I de Llobet, August Vidal and Ricard Mesia (2011). Dasatinib induces petechiae in athymic mice in a rapid and reversible manner. *Blood*.
- Khan EM, Heidinger JM, Levy M, Lisanti MP, Ravid T, Goldkorn T (2006). Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking. *J Biol Chem* **281**: 14486-93.
- Kim LC, Rix U, Haura EB (2010). Dasatinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 415-25.

- Kim LC, Song L, Haura EB (2009a). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **6**: 587-95.
- Kim MP, Park SI, Kopetz S, Gallick GE (2009b). Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis. *Cell Tissue Res* **335**: 249-59.
- Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM (2003). STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem* **278**: 1671-9.
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**: 325-37.
- Kruser TJ, Wheeler DL (2010). Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* **316**: 1083-100.
- Kunte DP, Wali RK, Koetsier JL, Hart J, Kostjukova MN, Kilimnik AY *et al* (2005). Down-regulation of the tumor suppressor gene C-terminal Src kinase: an early event during premalignant colonic epithelial hyperproliferation. *FEBS Lett* **579**: 3497-502.
- Lai SY, Johnson FM (2010). Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* **13**: 67-78.
- Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H (2009). Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* **15**: 1133-9.
- Lee HC, An S, Lee H, Woo SH, Jin HO, Seo SK *et al* (2008). Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation. *Mol Cancer Res* **6**: 996-1002.
- Lee M, Kim JY, Anderson WB (2004). Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbol myristate acetate and H₂O₂. *J Biol Chem* **279**: 48692-701.
- Lee SH, Koo KH, Park JW, Kim HJ, Ye SK, Park JB *et al* (2009). HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress. *Carcinogenesis* **30**: 1997-2004.
- Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* **28**: 3801-13.
- Li C, Iida M, Dunn EF, Wheeler DL (2010). Dasatinib blocks cetuximab- and radiation-induced nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*.
- Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A *et al* (2006). Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 363-8.
- Liebmann C (2011). EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol* **331**: 222-31.

- Lin YC, Wu MH, Wei TT, Chuang SH, Chen KF, Cheng AL *et al* (2012). Degradation of epidermal growth factor receptor mediates dasatinib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia* **14**: 463-75.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**: 242-5.
- Lo HW, Hung MC (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* **94**: 184-8.
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K *et al* (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* **47**: 6658-61.
- Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D *et al* (2009). Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res* **69**: 6889-98.
- Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB *et al* (2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res* **67**: 8240-7.
- Lu YC, Chen HC (2011). Involvement of lipid rafts in adhesion-induced activation of Met and EGFR. *J Biomed Sci* **18**: 78.
- Luo FR, Barrett YC, Yang Z, Camuso A, McGlinchey K, Wen ML *et al* (2008). Identification and validation of phospho-SRC, a novel and potential pharmacodynamic biomarker for dasatinib (SPRYCEL), a multi-targeted kinase inhibitor. *Cancer Chemother Pharmacol* **62**: 1065-74.
- Luo FR, Yang Z, Camuso A, Smykla R, McGlinchey K, Fager K *et al* (2006). Dasatinib (BMS-354825) pharmacokinetics and pharmacodynamic biomarkers in animal models predict optimal clinical exposure. *Clin Cancer Res* **12**: 7180-6.
- Lurje G, Lenz HJ (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **77**: 400-10.
- Marcotte R, Zhou L, Kim H, Roskelly CD, Muller WJ (2009). c-Src associates with ErbB2 through an interaction between catalytic domains and confers enhanced transforming potential. *Mol Cell Biol* **29**: 5858-71.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 903-13.
- Martin TA, Jiang WG (2010). Hepatocyte growth factor and its receptor signalling complex as targets in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **10**: 2-6.
- Mass RD (2004). The HER receptor family: a rich target for therapeutic development. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 932-40.
- Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP (2011). Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood* **117**: 5198-206.

McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK (2001). Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3665-74.

Mendelsohn J (2001). The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **8**: 3-9.

Mendelsohn J, Baselga J (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **19**: 6550-65.

Mendelsohn J, Baselga J (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* **21**: 2787-99.

Milas L, Fang FM, Mason KA, Valdecanas D, Hunter N, Koto M *et al* (2007). Importance of maintenance therapy in C225-induced enhancement of tumor control by fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**: 568-72.

Milas L, Mason KA, Ang KK (2003). Epidermal growth factor receptor and its inhibition in radiotherapy: in vivo findings. *Int J Radiat Biol* **79**: 539-45.

Mitra D, Brumlik MJ, Okamgba SU, Zhu Y, Duplessis TT, Parvani JG *et al* (2009). An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol Cancer Ther* **8**: 2152-62.

Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A (2011). Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res* **17**: 5546-52.

Mueller KL, Hunter LA, Ethier SP, Boerner JL (2008). Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res* **68**: 3314-22.

Mueller KL, Yang ZQ, Haddad R, Ethier SP, Boerner JL (2010). EGFR/Met association regulates EGFR TKI resistance in breast cancer. *J Mol Signal* **5**: 8.

Nagaraj NS, Washington MK, Merchant NB (2011). Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth. *Clin Cancer Res* **17**: 483-93.

Nautiyal J, Yu Y, Aboukameel A, Kanwar SS, Das JK, Du J *et al* (2010). ErbB-inhibitory protein: a modified ectodomain of epidermal growth factor receptor synergizes with dasatinib to inhibit growth of breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **9**: 1503-14.

Nguyen TK, Rahmani M, Harada H, Dent P, Grant S (2007). MEK1/2 inhibitors sensitize Bcr/Abl+ human leukemia cells to the dual Abl/Src inhibitor BMS-354/825. *Blood* **109**: 4006-15.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S9-15.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR *et al* (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**: 2-16.

Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 876-85.

O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC (2007). Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* **44**: 2497-506.

Okamoto W, Okamoto I, Yoshida T, Okamoto K, Takezawa K, Hatashita E *et al* (2010). Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Mol Cancer Ther* **9**: 1188-97.

Packer LM, Rana S, Hayward R, O'Hare T, Eide CA, Rebocho A *et al* (2011). Nilotinib and MEK inhibitors induce synthetic lethality through paradoxical activation of RAF in drug-resistant chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **20**: 715-27.

Patel D, Bassi R, Hooper A, Prewett M, Hicklin DJ, Kang X (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int J Oncol* **34**: 25-32.

Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CH, Magee AI *et al* (2007). Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation. *J Biol Chem* **282**: 6415-24.

Potter VR (1958). The biochemical approach to the cancer problem. *Fed Proc* **17**: 691-7.

Premkumar DR, Jane EP, Agostino NR, Scialabba JL, Pollack IF (2010). Dasatinib synergizes with JSI-124 to inhibit growth and migration and induce apoptosis of malignant human glioma cells. *J Carcinog* **9**.

Pueyo G, Mesia R, Figueras A, Lozano A, Baro M, Vazquez S *et al* (2010). Cetuximab may inhibit tumor growth and angiogenesis induced by ionizing radiation: a preclinical rationale for maintenance treatment after radiotherapy. *Oncologist* **15**: 976-86.

Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G *et al* (2009). Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer* **115**: 2482-90.

Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W *et al* (2005). The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 795-805.

Raju U, Riesterer O, Wang ZQ, Molkenkine DP, Molkenkine JM, Johnson FM *et al* (2012). Dasatinib, a multi-kinase inhibitor increased radiation sensitivity by interfering with nuclear localization of epidermal growth factor receptor and by blocking DNA repair pathways. *Radiother Oncol*.

Riesterer O, Mason KA, Raju U, Yang Q, Wang L, Hittelman WN *et al* (2009). Enhanced response to C225 of A431 tumor xenografts growing in irradiated tumor bed. *Radiother Oncol* **92**: 383-7.

- Rodemann HP, Wouters BG (2011). Molecular and translational radiation biology/oncology: what's up? *Radiother Oncol* **99**: 257-61.
- Roskoski R, Jr. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 1155-64.
- Roskoski R, Jr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1-14.
- Saad F (2009). Src as a therapeutic target in men with prostate cancer and bone metastases. *BJU Int* **103**: 434-40.
- Saki M, Toulany M, Sihver W, Zenker M, Heldt JM, Mosch B *et al* (2012). Cellular and molecular properties of (90)Y-labeled cetuximab in combination with radiotherapy on human tumor cells in vitro. *Strahlenther Onkol* **188**: 823-32.
- Santiago A, Eicheler W, Bussink J, Rijken P, Yaromina A, Beuthien-Baumann B *et al* (2010). Effect of cetuximab and fractionated irradiation on tumour micro-environment. *Radiother Oncol*.
- Sato K, Nagao T, Iwasaki T, Nishihira Y, Fukami Y (2003). Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells. *Genes Cells* **8**: 995-1003.
- Scaltriti M, Baselga J (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* **12**: 5268-72.
- Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-25.
- Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G, Lin PS (2003). ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* **22**: 5855-65.
- Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD *et al* (1997). Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* **15**: 1191-7.
- Sen B, Johnson FM (2011). Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct* **2011**: 865819.
- Sen B, Peng S, Saigal B, Williams MD, Johnson FM (2010). Distinct interactions between c-Src and c-Met in mediating resistance to c-Src inhibition in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **17**: 514-24.
- Sen B, Peng S, Woods DM, Wistuba I, Bell D, El-Naggar AK *et al* (2011). STAT5A-mediated SOCS2 expression regulates Jak2 and STAT3 activity following c-Src inhibition in head and neck squamous carcinoma. *Clin Cancer Res* **18**: 127-39.
- Sen B, Saigal B, Parikh N, Gallick G, Johnson FM (2009). Sustained Src inhibition results in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation and cancer cell survival via altered Janus-activated kinase-STAT3 binding. *Cancer Res* **69**: 1958-65.

- Seoane S, Montero JC, Ocana A, Pandiella A (2010). Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **102**: 1432-46.
- Shah NP, Kasap C, Weier C, Balbas M, Nicoll JM, Bleickardt E *et al* (2008). Transient potent BCR-ABL inhibition is sufficient to commit chronic myeloid leukemia cells irreversibly to apoptosis. *Cancer Cell* **14**: 485-93.
- Shao H, Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ (2003). Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* **63**: 3923-30.
- Silva CM (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* **23**: 8017-23.
- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ (1995). Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4562-6.
- Skvortsov S, Jimenez CR, Knol JC, Eichberger P, Schiestl B, Debbage P *et al* (2011). Radioresistant head and neck squamous cell carcinoma cells: intracellular signaling, putative biomarkers for tumor recurrences and possible therapeutic targets. *Radiother Oncol* **101**: 177-82.
- Society AC. (2008). www.cancer.org.
- Song JY, Lee SW, Hong JP, Chang SE, Choe H, Choi J (2009). Epidermal growth factor competes with EGF receptor inhibitors to induce cell death in EGFR-overexpressing tumor cells. *Cancer Lett* **283**: 135-42.
- Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB (2006). Dasatinib (BMS-354825) selectively induces apoptosis in lung cancer cells dependent on epidermal growth factor receptor signaling for survival. *Cancer Res* **66**: 5542-8.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG *et al* (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**: 767-78.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**: 153-208.
- Tehrani S, Tomasevic N, Weed S, Sakowicz R, Cooper JA (2007). Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11933-8.
- Thariat J, Milas L, Ang KK (2007). Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69**: 974-84.
- Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ (1999). Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1415-20.
- Toulany M, Dittmann K, Kruger M, Baumann M, Rodemann HP (2005). Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol* **76**: 143-50.

- Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K *et al* (2006). Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* **12**: 4119-26.
- Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, Sak A, Wang S, Chen J *et al* (2008). Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* **7**: 1772-81.
- Toulany M, Minjgee M, Kehlbach R, Chen J, Baumann M, Rodemann HP (2010). ErbB2 expression through heterodimerization with erbB1 is necessary for ionizing radiation- but not EGF-induced activation of Akt survival pathway. *Radiother Oncol*.
- Toulany M, Rodemann HP (2010). Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation. *Nuklearmedizin* **49 Suppl 1**: S26-30.
- Trevino JG, Summy JM, Lesslie DP, Parikh NU, Hong DS, Lee FY *et al* (2006). Inhibition of SRC expression and activity inhibits tumor progression and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells in an orthotopic nude mouse model. *Am J Pathol* **168**: 962-72.
- Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E *et al* (2010). Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* **17**: 77-88.
- Vadlamudi RK, Sahin AA, Adam L, Wang RA, Kumar R (2003). Heregulin and HER2 signaling selectively activates c-Src phosphorylation at tyrosine 215. *FEBS Lett* **543**: 76-80.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**: 1029-33.
- Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaepfli JM *et al* (2001). Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* **61**: 5090-101.
- Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J (1999). p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* **274**: 26776-82.
- Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G (2008). The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* **68**: 93-106.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-99.
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC *et al* (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* **8**: 1359-68.
- Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-14.
- Weickhardt AJ, Tebbutt NC, Mariadason JM (2010). Strategies for overcoming inherent and acquired resistance to EGFR inhibitors by targeting downstream effectors in the RAS/PI3K pathway. *Curr Cancer Drug Targets* **10**: 824-33.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**: 1-8.

Wessel D, Flugge UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-3.

Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*.

Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S *et al* (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**: 3944-56.

Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Dunn EF, Armstrong EA *et al* (2009). Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther* **8**: 696-703.

Xi S, Zhang Q, Dyer KF, Lerner EC, Smithgall TE, Gooding WE *et al* (2003). Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biol Chem* **278**: 31574-83.

Yoshida T, Okamoto I, Okamoto W, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K *et al* (2009). Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci*.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Aunque parezca que ésta es la parte más fácil de la tesis, son tantas las personas que han contribuido de forma directa o indirecta en su desarrollo, que nunca se sabe por donde empezar y si te estas dejando alguien por el camino.

En primer lugar, quisiera agradecer al **Josep Balart** la tarea de dirección llevada a cabo en esta tesis, ya que sin él todo esto no habría sido posible. También quiero agradecerle el haberme abierto las puertas del grupo RBI, el haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación en el 2008 y poder haber llegado hasta donde hoy estamos.

Naturalmente, también quiero darles las gracias a las que son o han formado parte del grupo RBI durante estos años. **Gemma** y **Lara**, gracias por vuestro apoyo, consejos y por vuestra disposición a echarme una mano en todo. ¡¡Sin vuestra ayuda este proyecto no habría llegado tan lejos!!

A todos mis compañeros del laboratorio **LRT1**, los que estuvieron y los que aun están, que cada uno de ellos a su manera ha hecho más ameno el trabajo de investigar. Ya que me sería imposible poner a todos y cada uno de ellos con los que he compartido estos casi 5 años, me gustaría destacar a todo el grupo de **angiogénesis** por su colaboración, ayuda y recomendaciones durante todo el desarrollo de este proyecto; al fin y al cabo hemos trabajado poyata con poyata. A **Miguel**, por el apoyo y el ánimo que me brindo durante estos años y ¡¡por hacer del laboratorio un lugar más divertido!! También a los compañeros del **LRT2**, en especial a **Juana Fernández** (por echarme una mano con los *pull-down*) y a **Mireia Morell** (por esa secuenciación de última hora).

Me gustaría también agradecerles todos los miembros del Departamento de Radioterapia, en especial a **Ferran Guedea**, **Arturo** y **Karina**. No quisiera olvidarme tampoco de **Mila** y **Pepe** (por hacernos un hueco, a veces imposible, para irradiar células o ratones) y por supuesto, de todos los **técnicos de radioterapia** (por facilitarnos el trabajo y la paciencia con las dosis y los montajes que les preparábamos en las salas de radioterapia).

Me gustaría agradecer, por hacer posible que este proyecto haya llegado hasta aquí con sus aportaciones, a: **Ira Skvortsova**, la colaboración que llevamos a cabo durante el año

2012 con su grupo de investigación en Innsbruck; a la gente del **Estabulario**; al Departamento de Patología Anatómica de Bellvitge, y en especial a **August Vidal**; al Servicio de Bioquímica de Bellvitge, en especial a **María José Castro Castro**; y a la **AECC** y **Merck**.

A mis amigos, con los que hemos celebrado los momentos más dulces y por haber estado durante los momentos más complicados de este largo viaje. A **Marc, Gisela, Carla, Roberto, Dani, Uri** por todo y por nada, simplemente por estar ahí en todo momento y para lo que fuera. A **Irene** y **Manolo** (con un agradecimiento especial por sus correcciones y sugerencias), **Tere, Joan, Marc, Brigos** (gracias por esa portada de tesis!!), **Cris, Albert, Jordi, Joan** por esos momentos que me han ayudado a desconectar de la ciencia y de la tesis. Tampoco quisiera olvidarme de **Paula, Amaya, Alicia, Miriam, Jonny** y **Curni** que de algún modo u otro también habéis sido participes de este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer a toda mi familia su apoyo. A **mis padres**, que me acompañaron durante todo este viaje de forma incondicional. Gracias por vuestro esfuerzo, apoyo, consejos y por confiar en todo momento en lo que hacía. A **mis tíos y primos**, por vuestros ánimos y por interesaros en todo momento por la tesis.

Gracias a todos.