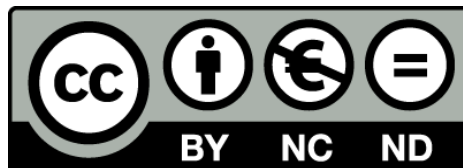


Teràpia dirigida a receptors ErbBs i teràpia antiangiogènica en tumors germinals testiculars

Mercè Juliachs Milà



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

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

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



**Teràpia dirigida a receptors ErbBs
i teràpia antiangiogènica
en tumors germinals testiculars**

Mercè Juliachs Milà, 2013

TERÀPIA DIRIGIDA A RECEPTORS ErbBs I TERÀPIA ANTIANGIOGÈNICA EN TUMORS GERMINALS TESTICULARS

Memòria de Tesi Doctoral

Mercè Juliachs Milà

Barcelona 2013

TERÀPIA DIRIGIDA A RECEPTORS ErbBs I TERÀPIA ANTIANGIOGÈNICA EN TUMORS GERMINALS TESTICULARS

Memòria de Tesi Doctoral presentada per
Mercè Juliachs Milà per optar al Grau de Doctor

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Francesc Viñals Canals
a l'Institut Català d'Oncologia i
l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Bellvitge

Tesi adscrita al Departament de Ciències Fisiològiques II
Programa de doctorat en Biomedicina
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, 2013

FRANCESC VIÑALS CANALS
Director de tesi

MERCÈ JULIACHS MILÀ
Doctoranda

A l'Avi Manel,

*Per despertar-me la curiositat parlant-me
per primer cop dels gens i dels mems,*

Gràcies!

Vull agrair la realització de la portada a la meva àvia Maria Vidal i Cuadras.

AGRAÏMENTS

Quan comences la tesi doctoral veus aquest dia molt lluny, tant lluny que sembla que no hagi d'arribar mai; i aquí el tenim. Ho hem aconseguit, i parlo en plural perquè jo sola segur que no ho hagués fet, i ni la meitat de bé. En totes les coses que fem sempre hi ha gent a qui agrair l'ajuda, el consell i el suport; i aquest cas no és una excepció ni molt menys.

Primer de tot vull agrair a Francesc Vinyals que hagi confiat en mi i hagi sigut el meu director de tesi. Ha estat un gran director en tots els aspectes, i és que una tesi doctoral no és simplement el desenvolupament d'un projecte científic, sinó que també és un procés formatiu tant professional com personal. Gràcies per fer-me de guia al iniciar-me en el món científic, per ensenyar-me i per motivar-me a continuar i a millorar. I també per fer el treball al laboratori un espai de compartir anècdotes i riures. Ha estat un honor i una sort treballar amb tu.

Vull donar les gràcies sobretot a les persones que m'han ajudat a realitzar aquest treball. A la Wilmar per ser un gran referent a seguir i per ensenyar-me, tenint tanta paciència, a treballar amb els ratolins. A l'Agnès per ajudar-me tantíssimes vegades amb mil coses i sobretot amb les immunos, i per donar-me tants consells i compartir tantes converses no tant professionals...; molta de la feina feta en aquesta tesi tu hi has participat molt! Una altre persona a qui li vull agrair l'ajuda amb els ratolins és a l'Alberto; i no només per deixar-me treballar amb els seus models, sinó perquè m'ha ajudat molt tant amb assessorament tècnic com ajudant-me directament amb les seves mans algunes d'aquelles tardes interminables a l'estabulari. A l'August Vidal per deixar que l'emprenyés de tant en tant al demanar valoracions histopatològiques, i a l'Oriol per donar tantes bones idees al seminaris de grup. Gràcies també a tota la gent del grup d'Angiogènesi, per ser uns grans companys de laboratori, per ajudar constantment a tirar endavant i compartir tantes hores tant agradables de dinars i cafès! Moltes gràcies Mar, Lúdia, Gaby, Alba, Elisenda, Susana i Marta Paez. I als que heu arribat més recentment i a les noies de pràctiques, que encara que feu estades breus animeu moltíssim; Nicklas, Anoeak, Mariona, Yaiza i Rosari.

A la Maria, amb qui he passat tants i tants bons moments dins i fora del laboratori, li dec més que un agraïment; gràcies per ser-hi sempre!! I vull agrair també molt especialment a la Marta Vives haver estat tant a prop. Has sigut una companya immillorable de tesi! Moltes gràcies per aportar tantíssima energia Antònia!!

Però no només a la gent del grup li dec molta ajuda rebuda, sinó que al LRT tenim la sort de ser un laboratori obert compartint espais i idees entre tots. Moltes gràcies Helena per tants consells rebuts i per els moments tant divertits a cultius! Cristina, no puc parlar de cultius sense pensar en tu i és que ets una de les persones amb qui he rigut més cantant amb la bata verda... però a més a més t'he d'agrair també suport científic i emocional. Ets boníssima Puig! A la Mireia li dec totes les anècdotes dels primers anys al laboratori (que quedin entre nosaltres ;)), gràcies perquè has estat un dels suports més importants tots aquests anys!! Moltes gràcies flor!! A en Ferran vull agrair-li moltes coses, però sobretot el donar-me suport en tot moment, fer-me riure tant i aportar tanta energia per continuar amb el que sigui que arribi de nou! A la resta de la "pandilla"; la Nuri, en Joan, en Paco i la Natàlia, sincerament no esperava trobar un ambient tant càlid, sou sorprenents i heu donat (i donareu) moments indescriptiblement divertits! A la Clara, la meva companya de testicle, vull agrair-li no només l'ajuda amb les cèl·lules, sinó que encara que hagi estat massa temps fora sempre ha aconseguit ser a prop!! I a tots els becàris del laboratori LRT: la Lara, la Marta, la Sara, la Maria, Curro, Samuel, l'Alba, l'Edu, Luís, Raúl, Marta, Miguel, Carlos, Rafa, Míriam, Ahmed, Jacopo, Vane, Griselda... els que encara hi sou, els que acabeu d'arribar i els que ja heu marxat. Tots heu fet que tot aquest temps al laboratori hagi sigut fantàstic. Merci per tots els moments a la sala de becaris fent pinya, fent cafès i tanta tanta festa, alguna més esbojarrada que d'altre! També vull agrair a les noies que m'han acompanyat en aquests últims mesos d'escriptura, la seva intensa presència i la seva atenció, la Mònica, la Nadia, la Gemma, la Kira i la Maribel, i també la Marga. Sou molt divertides!! I a tota la gent del laboratori que heu donat suport i heu ajudat! Moltes gràcies a tots!

A nivell científic no puc passar sense mencionar la Mariona i la Inma, dues de les persones que més m'han ajudat i influenciat en la meva curta carrera professional. Mariona, moltes gracies per la oportunitat i la confiança que vas dipositar en mi al principi de tot, i encara que fos abans de començar la tesi, no hauria arribat aquí si no hagués sigut per tu. Gracias per ser-hi llavors i ser-hi ara!! ¡Inma, tú fuiste la primera en enseñarme todo!! Gracias porque lo hiciste muy bien, por todos los buenos consejos,

por la paciencia que tuviste conmigo, por motivarme siempre a seguir adelante y por continuar siendo una gran amiga pese a la distancia. ¡Muchas gracias quilla!

No vull deixar-me però tots aquells que encara que potser més lluny del laboratori també heu ajudat a que això sigui possible. Tota la gent de la universitat, que han acompanyat i compartit tot aquest camí. Gràcies especialment a la Irma, en Jordi i la Gina, perquè al haver compartit pis amb mi, volguessin o no, han hagut d'aguantar algun que altre assaig de seminari! Encara que d'altres, com l'Ester, l'Albert o l'Helena també han hagut d'aguantar altres tipus de discursos!! En Toni, per suportar a dos *cutxinus*, i a tots per aconseguir que continuem essent el que som!! A la Sílvia vull agrair-li molts moments de desconnexió tant necessaris, i per estar tant pendent sempre de tot. A tots els de Ribes *merci* per preocupar-vos dia a dia de com va tot, per estar sempre a punt, per ser tant propers, i per ser els de sempre coi!! Joana, *merci* per compartir tantes xerrades realment translacionals!!

I ja per acabar moltes gràcies a tota la meva família. A tots!!! Gràcies a tots els tiets per motivar-me tant des de temps tant inicials!!! Ens heu motivat a tota la cosinada a estudiar, a treballar de valent i sobretot a ser molt curiosos i voler aprendre sempre. Encara recordo aquells dinars on l'escriptura de les fórmules als tovallons acompanyava cada sobretaula, en el fons aquest és l'inici de tot plegat! Gràcies a tots els meus avis i àvies per motivar-me i per interessar-vos sempre per mi, heu estat i sou un referent a seguir. Especialment als dos avis que ja no hi són i que tant m'agradaria que poguessin ser avui aquí, a l'avi Manel i l'avi Baldomero, aquesta tesi és per vosaltres! Iaia, moltes gràcies per esforçar-te tant pintar la portada, ha quedat realment bonica i significa molt per mi!!! I no puc acabar sense agrair als meus pares i els meus germans, cunyada i nebot, per simplement estar aquí i donar aquell suport incondicional que només vosaltres podeu donar.

Moltíssimes gràcies a tots!

GLOSSARI

µg	microgram	H&E	hematoxilina-eosina
µl	microlitre	HCC	carcinoma hepatocel·lular
µM	micromolar	HCG	α-gonadotropina coriònica humana
AFP	α-fetoproteïna	HRP	de l'anglès, horseradish peroxidase
ANGPT	angiopoietina	IAP	proteïna inhibidora d'apoptosi
CC	coeficient de combinació	IC50	concentració inhibidora del 50%
CD117	c-KIT	IHQ	immunohistoquímica
CDDP	cisplatí	IP	Immunoprecipitat
c-KIT	de l'anglès, <i>stem cell factor receptor</i>	JNK	cinases c-Jun N-terminal
DE	desviació estàndard	kDa	quilo-Daltons
DMSO	dimetil sulfòxid	kg	quilogram
DNA	àcid desoxirribonucleic	mAb	anticossos monoclonals
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>	MAPK	proteïnes cinases activades per mitògens
EGF	factor de creixement epidèrmic	ml	mil·lilitre
EGFR	receptor del factor de creixement epidèrmic	MMR	de l'anglès, <i>mismatch repair</i>
EMA	antigen epitelial de membrana	mRNA	RNA missatge
ERK	cinases reguladores de senyals extracel·lulars	mTOR	de l'anglès, <i>mammalian target of rapamycin</i>
EV	de l'anglès, <i>empty vector</i>	MTT	bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazoli
FBS	sèrum fetal boví	NER	reparació d'excisió de nucleòtids
FDA	administració de drogues i aliments dels Estats Units	NF-κB	factor nuclear de κB
FGF	factor de creixement de fibroblasts	NRG	neuregulina
FLT3	de l'anglès, <i>FMs-like tyrosine kinase 3</i>	NSCLC	càncer de pulmó de cèl·lula no petita, de l'anglès <i>non-small cell lung cancer</i>
FTV	fracció del volum tumoral	O/N	de l'anglès, <i>over-night</i>
GCT	tumor de cèl·lula germinal	PBS	de l'anglès, <i>phosphate-buffered saline</i>
GIST	tumor de l'estroma gastrointestinal	PDGF	factor de creixement derivat de les plaquetes
GRB2	de l'anglès, <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	PDGFR	receptor del factor de creixement derivat de les plaquetes
GTP	guanosina 5'-trifosfat		

PFS	de l'anglès, <i>progression free survival</i>
PI3K	fosfatidil-inositol 3-cinasa
PLAP	fosfatasa alcalina placentària
PLCγ	fosfolipasa C
RCC	carcinoma de cèl·lula renal
RNA	àcid ribonucleic
RTK	receptor tirosina cinasa
RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa a temps real
SDS	dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	de l'anglès <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SH2	dominis d'homologia a Src-2
shRNA	de l'anglès, short-hairpin
STAT	transductor de senyal i activador de proteïnes de transducció
TBS	de l'anglès, tris buffered saline
TGF	de l'anglès, <i>transforming growth factor</i>

TGT	tumor germinal testicular
TGTM	tumor germinal testicular metastàtic
TGTNS	tumors germinals testiculars no-seminomatosos
TKIs	petites molècules inhibidores de tirosina cinases
TLS	síntesi translesió
TMA	de l'anglès, <i>tissue macro array</i>
TUNEL	de l'anglès, <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotina-dUTP nick end labeling</i> .
U.A.	unitats arbitràries
VEGF	factor de creixement vascular endotelial
VEGFR	receptor del factor de creixement vascular endotelial
vSMC	de l'anglès, <i>vascular smooth muscle cell</i>

INDEX

AGRAÏMENTS

GLOSSARI

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1.TUMORS GERMINALS TESTICULARS	1
1.1 Introducció	1
1.2 Epidemiologia dels tumors germinals testiculars	2
1.3 Etiologia i factors de risc	3
1.4 Classificació histològica dels tumors germinals testiculars	4
1.4.1 Tumors germinals testiculars seminomes	5
1.4.1.1 Seminomes	5
1.4.1.2 Seminomes amb cèl·lules sincitiotrofoblàstiques	5
1.4.1.3 Seminomes espermatocítics	5
1.4.2 Tumors germinals testiculars no seminomes	5
1.4.2.1 Carcinomes embrionaris	6
1.4.2.2 Teratomes	6
1.4.2.3 Carcinomes de sac vitel·lí	7
1.4.2.4 Coriocarinomes	7
1.4.2.5 TGTs de components mixtes	7
1.5 Tractament	8
1.6 Resistència a cisplatí	10
1.6.1 El cisplatí	10
1.6.2 Mecanismes de resistència moleculars a CDDP	11
1.6.2.1 Mecanismes de resistència previs a la unió a DNA	11
1.6.2.2 Mecanismes de resistència en la unió a DNA	11

1.6.2.3 Mecanismes de resistència posteriors a la unió a DNA	12
1.6.2.4 Mecanismes de resistència independents a la unió a DNA	14
1.6.3 Resistència a cisplatí en TGTs	16
2. RECEPTORS TIROSINA CINASA	18
2.1 Receptors ErbBs	18
2.1.1 Família de receptors ErbBs	18
2.1.2 ErbBs i càncer	21
2.1.3 Teràpies dirigides a receptors ErbBs	22
2.1.4 ErbBs i tumors germinals testiculars	26
2.2 Receptors dels factors de creixement derivats de plaquetes (PDGFRs)	27
2.2.1 Família de receptors PDGFRs	27
2.2.2 PDGFRs i càncer	28
2.2.3. Teràpies dirigides a PDGFRs	29
2.2.3.1 L'activitat antiangiogènica dels inhibidors	31
2.3 Vies de senyalització dels RTKs	32
2.3.1 PI3K/AKT	32
2.3.3 Cascada de les MAPK ERKs	35
2.3.4 Via de senyalització STAT	38
3 TERÀPIA ANTIANGIOGÈNICA	39
3.1 L'angiogènesi tumoral	39
3.2 Teràpies amb inhibidors angiogènics, dirigides a VEGFRs	41
3.3 PDGFRs i teràpies antiangiogèniques en tumors germinals testiculars	42
MATERIALS I MÈTODES	45
1 ANIMALS I ESTABULACIÓ	45
1.1 Implantació ortotòpica de tumors germinals testiculars en ratolins atímics	45
1.2 Models de tumors ortotòpics testiculars utilitzats	46
1.3 Tractaments <i>in vivo</i>	47
1.3.1 Esquema de tractament dels experiments amb el TGT38	47
1.3.2 Esquema de tractament de l'experiment amb el TGT44	48
1.4 Obtenció i processament de les mostres tumorals	49

1.5 Càlcul del coeficient de combinació	50
2 CULTIUS CEL·LULARS	50
2.1 Manteniment de les línies cel·lulars en cultiu	51
2.2 Producció de constructes lentivirals shRNA per a ErbB3 i PDGFR β	51
2.3 Generació de línies cel·lulars estables transduïdes amb els vectors lentivirals shErbB3 i shPDGFR β	53
2.4 Assaig de viabilitat cel·lular per incorporació de MTT	53
2.5 Anàlisi del creixement de les cèl·lules SuSa-shErbB3	54
2.6 Tumors generats de les línies cel·lulars SuSa-EV i SuSa-shErbB3.2	54
2.7 Inhibidors i factors de creixement utilitzats <i>in vitro</i>	55
3 ESTUDIS HISTOLÒGICS DE LES MOSTRES TUMORALS	55
3.1 Immunofluorescències	55
3.1.1 Marcatge amb CD31 i Ki67	56
3.1.2 Detecció de mort cel·lular amb marcatge de TUNEL	57
3.1.3 Doble marcatge d'ErbB1 i ErbB2	58
3.3 Tinció hematoxilina-eosina	59
3.4 Quantificació d'àrees necròtiques tumorals	59
3.5 Immunohistoquímiques	60
3.5.1 Immunohistoquímica d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3	60
3.5.2 Caracterització del TGT44	61
3.5.3 Immunohistoquímica de PDGFR β	61
4 PROCESSAMENT DE MOSTRES PROTÈIQUES	62
4.1 Extracció proteica	63
4.1.1 Extracció proteica de teixits tumorals	63
4.1.2 Extracció proteica de cultius cel·lulars	63
4.2 Immunoprecipitació	63
4.3 Electroforesi en gels de poli-acrilamida/SDS i <i>western blot</i>	64
4.3.1 SDS-Page i transferència de proteïnes	64
4.3.2 <i>Western blot</i>	65
4.3.3 Quantificació de l'expressió proteica analitzada per <i>western blot</i>	67

5 ANÀLISIS DE MOSTRES DE RNA	67
5.1 Extracció de RNA de mostres tumorals i cultius cel·lulars	67
5.2 Obtenció de cDNA per retrotranscripció	67
5.3 PCR quantitativa a temps real (RT-PCR)	68
6 ANÀLISIS ESTADÍSTICS	69
BASES DE L'ESTUDI	71
OBJECTIUS	73
RESULTATS	75
1. TERÀPIES DIRIGIDES A RECEPTORS ErbBs	75
1.1 Avaluació de l'efecte <i>in vivo</i> de les teràpies dirigides a receptors ErbBs en un model ortotòpic murí de coriocarcinoma testicular humà	75
1.1.1 Cetuximab i gefitinib bloquejen la fosforilació d'ErbB1 però no afecten l'activació d'ErbB2	75
1.1.2 Lapatinib, inhibidor dual d'ErbB1 i ErbB2, bloqueja el creixement tumoral de TGT38	78
1.1.3 Formació de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 en el TGT38	83
1.1.4 Expressió d'ErbB3 en TGTs	88
1.2 Avaluació de l'efecte <i>in vitro</i> de les teràpies dirigides a receptors ErbBs en línies de cèl·lules de TGTs	90
1.2.1 Efecte de gefitinib i lapatinib en la proliferació de línies cel·lulars de tumor testicular	90
1.2.2 Efecte de la inhibició d'ErbB3 en la línia tumoral testicular SuSa	93
1.2.3 Efecte de la inhibició de diferents receptors ErbBs en línies de cèl·lules tumorals testiculars	95
2. TERÀPIA ANTIANGIOGÈNICA	99
2.1 Avaluació de l'efecte <i>in vivo</i> de la teràpia antiangiogènica en un model ortotòpic murí de coriocarcinoma testicular humà.	99
2.1.1 Pazopanib bloqueja el creixement tumoral del TGT38	99
2.1.2 La combinació dels tractaments amb pazopanib i lapatinib bloqueja de manera sinèrgica el creixement del TGT38	102

2.2	Avaluació de l'efecte <i>in vivo</i> de la teràpia antiangiogènica en un nou model ortotòpic murí de tumor de sac vitel·lí testicular humà refractari a cisplatí	106
2.2.1	Caracterització del TGT44	106
2.2.2	Avaluació de l'efecte de pazopanib en el TGT44	109
2.3	Estudi de l'efecte directe de pazopanib en cèl·lules tumorals sensibles i resistent a CDDP	112
2.3.1	Efecte de pazopanib en la viabilitat cel·lular de les GCT27S-R	112
2.3.2	Activació del <i>loop</i> autocrí PDGF-BB/PDGFR β /AKT com a mecanisme de resistència en les GCT27R	115
2.4	Expressió de PDGFR β en pacients humans de TGTs	126
2.4.1	Els receptors PDGFRs es troben sobreexpressats en models ortotòpics de TGTs resistent a CDDP	126
2.4.2	Expressió de PDGFR β en pacients de TGTs no seminomatosos	131
	DISCUSSIÓ	135
	1. TERÀPIES DIRIGIDES A RECEPTORS ERBBS	135
	I. La senyalització del dímer ErbB2/ErbB3 aporta resistència a les teràpies dirigides contra ErbB1	135
	II. Paper d'ErbB3 en TGTs	137
	III. Inhibició combinada de receptors ErbBs més eficaç que la simple	139
	2. TERÀPIES ANTIANGIOGÈNIQUES	145
	I. Tractament dels TGTs amb antiangiogènics	145
	II. Pazopanib, i altres antiangiogènics	149
	3. RESISTÈNCIA A CDDP	150
	I. L'activació de l'eix autocrí PDGF-BB/PDGFR β /AKT aporta resistència a CDDP	150
	II. Resistència a CDDP en els TGTs	156
	CONCLUSIONS	159
	BIBLIOGRAFIA	161
	PUBLICACIONS	179

INTRODUCCIÓ

1.TUMORS GERMINALS TESTICULARS

1.1 Introducció

El testicle és un òrgan de l'aparell genital masculí amb funció exocrina i endocrina, produint els espermatozoides i secretant testosterona. El testicle es divideix en lòbuls formats pels conductes seminífers i l'illot intersticial de Leydig. Els conductes seminífers són els conductes productors de l'esperma on s'hi troben les cèl·lules de Sertoli que envolten les cèl·lules germinals i en controlen la proliferació, la diferenciació i la migració cap a la llum tubular. Les cèl·lules germinals migren durant la seva maduració des del pol basal de l'epiteli del conducte seminífer al pol apical. De les cèl·lules germinals primordials en deriven els espermatogonis que es diferencien fins esdevenir espermatozoides i s'alliberen a la llum del conducte seminífer (Figura I1) (Williams et al., 1985).

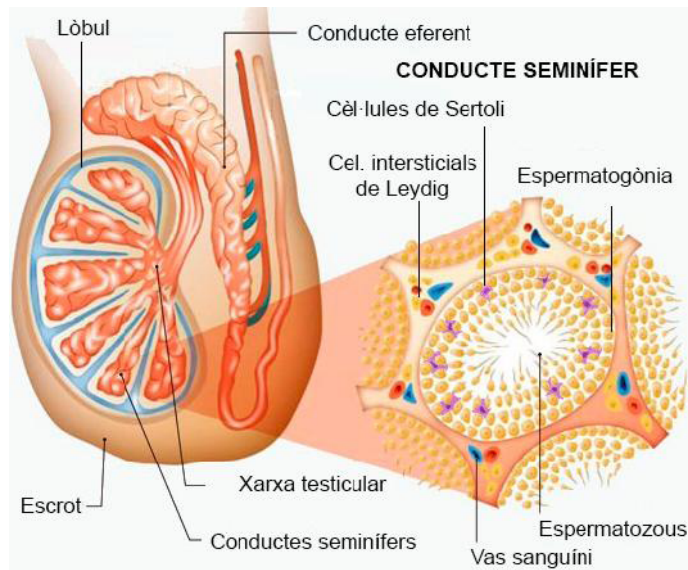


Figura I1. Esquema de l'anatomia del testicle i el conducte seminífer.

Dels tumors primaris testiculars el 95% són tumors de cèl·lula germinal testicular (TGTs), mentre que el 5% restant són neoplàsies no germinals, com de cèl·lules de Leydig, cèl·lules de Sertoli o limfomes (Winter and Albers, 2010).

1.2 Epidemiologia dels tumors germinals testiculars

Els tumors germinals testiculars (TGTs) són un cas paradigmàtic en oncologia ja que només representen entre el 0,5-1% del total de tumors que afecten als homes, però són la neoplàsia més comuna en homes de 15 a 35 anys (Bosl and Motzer, 1997). Tot i així són els tumors amb millors taxes de supervivència i es curen més del 95% dels pacients. La taxa de mortalitat europea per els tumors testiculars és de les més baixes, de 35 per 10.000.000 homes i any (Figura I2A) (La Vecchia et al., 2010).

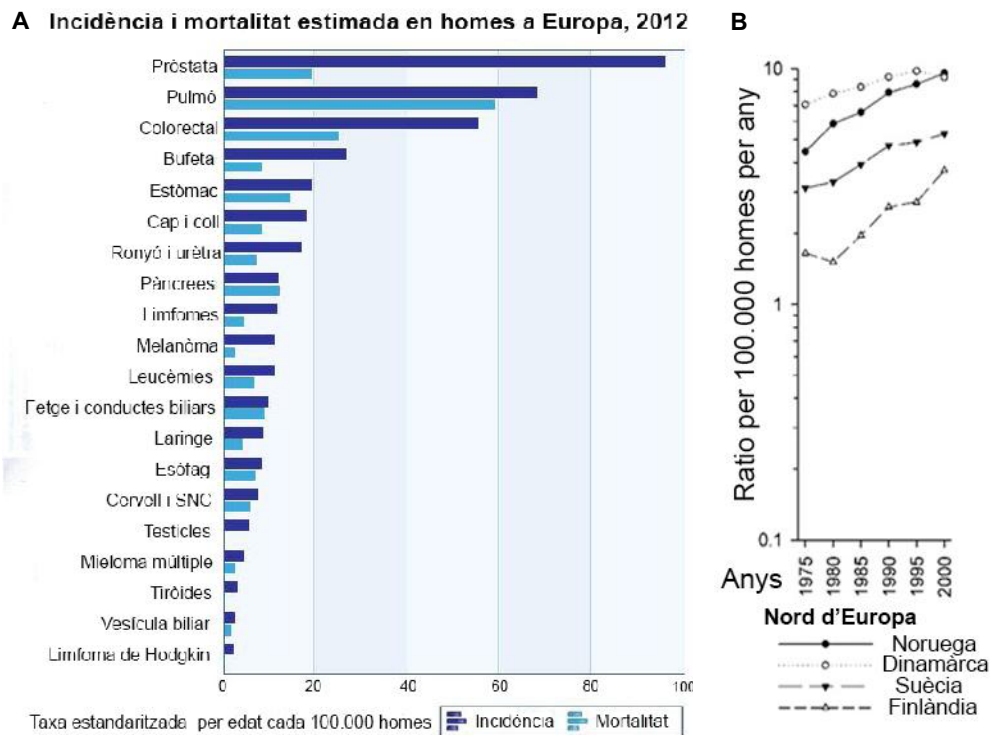


Figura I2. La incidència i mortalitat del càncer testicular en els països europeus. A) Estimació de les taxes d'incidència i mortalitat de diferents neoplàsies a Europa l'any 2012. El tumor testicular presenta de les taxes d'incidència i mortalitat més baixes. Figura adaptada de *European Cancer Observatory* webpage (ECO, 2013). B) La taxa d'incidència del tumor testicular a Europa té una tendència positiva, i incrementa des de finals dels anys 70. Figura adaptada de *Chia et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers. 2010.* (Chia et al., 2010)

Estudis sobre la incidència mundial dels tumors testiculars mostren que les taxes d'incidència més elevades es troben en les zones de poblacions caucàsiques, sobretot a Nord Amèrica i Europa amb uns 6-8 casos per 100 000 homes / any, mentre que la ràtio d'incidència mundial al 2002 era d'1,5 per 100.000 homes i any (Chia et al., 2010; ECO, 2013; Rosen et al., 2011). Malgrat ser una de les zones amb més incidència, a Europa els tumors testiculars presenten taxes d'incidència baixes en comparació amb altres neoplàsies (Figura I2A) (ECO, 2013). Tot i així estudis recents mostren com la incidència mundial ha incrementat en els últims 40-50 anys, sobretot en les zones d'incidència més elevada, com a Europa. Els motius d'aquest increment encara no són clars (Figura I2B). (Chia et al., 2010; Huyghe et al., 2003).

Els tumors testiculars són doncs els tumors sòlids més curables en adults, però les taxes d'incidència augmenten des de fa ja 40 anys. La importància radica sobretot en que són tumors que afecten a gent jove, i la mortalitat, per baixa que sigui es concentra en aquesta franja d'edat.

1.3 Etiologia i factors de risc

Les diferències en la incidència del càncer testicular segons àrees geogràfiques i ètnies fa entreveure diferents factors causals d'aquests tumors; incloent predisposició genètica, exposició als estrògens materns, perills laborals, dieta, hàbits fumadors i lloc de naixement. Amb tot l'etiologia dels tumors testiculars continua essent poc clara (Rosen et al., 2011).

De tots els factors de risc epidemiològics dels tumors testicular, com la síndrome de Klinefelter o antecedents familiars de tumors testiculars en familiars de primer grau (pare/germans), la criptorquídia és el factor de risc més clar (Albers et al., 2011). Aquest és un trastorn que consisteix en el descens incomplet dels testicles durant el desenvolupament o els mesos post natal. Un 10% dels tumors germinals presenten una història clínica amb aquest trastorn (Germà, 1991; McGlynn and Cook, 2009).

S'ha descrit també una possible etiologia infecciosa del tumor testicular, havent observat més freqüència de TGTs en pacients afectats amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH) i augment d'anticossos contra virus de la família dels herpes en pacients de TGTs (McGlynn and Cook, 2009). I pel que fa als factors de risc d'origen genètic,

s'ha descrit una microdeleció en el cromosoma Y (deleció gr/gr) que s'associa a la infertilitat i també a la susceptibilitat a desenvolupar TGT, encara que amb una penetrància baixa (Nathanson et al., 2005). També s'ha observat que els TGTs presenten un guany en el braç curt del cromosoma 12, i poques mutacions en gens individuals (Korkola et al., 2009; Sheikine et al., 2012).

1.4 Classificació histològica dels tumors germinals testiculars

La majoria dels TGTs s'originen en un creixement no invasiu conegut com a carcinoma *in situ* o neoplàsia intratubular de les cèl·lules germinals. L'absència de símptomes fa que en la majoria de casos no es detecti, i no és fins al cap d'uns cinc anys que el tumor degenera cap a una forma invasiva (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) els TGT es classifiquen histopatològicament en dos grans grups: els seminomes i els no-seminomes. Dels TGTs el 40% són seminomes i el 60% no-seminomes (Taula I1) (Schmoll et al., 2009a).

Classificació dels tumors de cèl·lula germinal testicular
Lesions precursors Neoplàsies de cèl·lula germinal intratubular Sense classificar (carcinoma <i>in situ</i>)
Seminoma Clàssic Amb cèl·lules sincitiotrofoblàstiques Espermatocític
No-seminoma Carcinoma embrionari Teratoma (madur, immadur o amb component maligne) Tumor de sac vitel·lí Coriocarcinoma Tumors de component mixte

Taula I1. Classificació dels GCTs testiculars segons l'OMS.
 Taula adaptada de (Winter and Albers, 2010)

1.4.1 Tumors germinals testiculars seminomes

Els seminomes apareixen com acumulacions de cèl·lules no diferenciades que s'assemblen a les cèl·lules germinals primitives (Ulbright and Roth, 1987). Aquests tumors normalment apareixen en la quarta o cinquena dècada de vida (Germà, 1991). L'OMS reconeix tres tipus de seminomes: el clàssic, el seminoma amb cèl·lules sincitiotrofoblàstiques i els espermacítics.

1.4.1.1 Seminomes

Els seminomes microscòpicament estan compostos per agregats sòlids de cèl·lules mononucleades, nuclis amb cromatina fina i uniforme i citoplasmes grans i ben definits. Immunohistoquímicament els seminomes són positius per a la fosfatasa alcalina placentària (PLAP) i per c-KIT (CD117), i negatius per a l'antigen epitelial de membrana (EMA), per a Ki-1 (CD30), l' α -fetoproteïna (AFP) i l' β -gonadotropina coriònica humana (HCG) (Bahrami et al., 2007).

1.4.1.2 Seminomes amb cèl·lules sincitiotrofoblàstiques

Els seminomes amb cèl·lules gegants sincitiotrofoblàstiques representen el 20% dels seminomes i es marquen positivament per la HCG i citoqueratines (Kurman et al., 1977). La presència d'aquests nivells de HCG no constitueixen un autèntic coriocarcinoma i per tant no comporten cap implicació en el pronòstic del tumor (Germà, 1991).

1.4.1.3 Seminomes espermatocítics

Els seminomes espermatocítics representen només l'1-2% dels seminomes i apareixen en homes de més de 50 anys. Clínicament presenten una evolució benigne i el risc de metastàsis és molt poc freqüent (Matoska et al., 1988).

1.4.2 Tumors germinals testiculars no seminomes

Per altra banda hi ha els tumors germinals testiculars no-seminomatosos (TGTNS) que comprenen tots els altres tipus de tumors de cèl·lula germinal, i inclouen tumors tant de llinatge embrionari (carcinoma embrionari i teratoma) com de components de teixits extraembrionaris (tumors de sac vitel·lí i coriocarcinoma). Només el 20% dels TGTNS són tumors purs, la gran majoria són tumors mixtes formats per dos o més tipus

cel·lulars, incloent tant cèl·lules de seminoma com de no seminoma. Tot i així la presència d'algun component no-seminomatós dins un seminoma defineix automàticament el tumor com a no-seminomatós, ja que la naturalesa dels tipus cel·lulars no-seminomatosos és menys favorable que els seminomes purs (Oosterhuis and Looijenga, 2005; Winter and Albers, 2010).

1.4.2.1 Carcinomes embrionaris

El carcinoma embrionari està present en més del 80% dels TGTs mixtes i té una incidència màxima en homes de 25 a 35 anys. El 60% dels pacients diagnosticats amb aquest component presenten metàstasis ganglionars limfàtiques regionals en el moment del diagnòstic (Vugrin et al., 1988). Els carcinomes embrionaris són positius immunohistoquímicament per a citoqueratines, però negatius per EMA. Són positius també per PLAP i OCT3/4 (*octamer binding transcription factor*) encara que no discriminen dels seminomes; i són negatius per HCG i c-KIT (Bahrami et al., 2007).

1.4.2.2 Teratomes

Els teratomes són tumors amb components procedents de les tres capes embrionàries: endoderm, mesoderm i ectoderm. Segons si el teixit predominant és adult, fetal-embrionari o s'expressa amb característiques malignes el tumor serà designat com a teratoma madur, immadur o de transformació maligne. El teratoma madur esta compost per cèl·lules madures i ben diferenciades. El teratoma immadur està compost per teixit embrionari menys diferenciat i amb més potencial invasiu que el tumor madur. I el teratoma amb transformació maligne, encara que és un tumor menys freqüent, té transcendència clínica ja que té un comportament més maligne que el teratoma immadur (Germà, 1991).

El teratoma en adults és poc freqüent i representa només el 3% de tots els TGTs, tot i així es troba en el 50% dels tumors mixtes. En infants en canvi, els teratomes es troben en estat de neoplàsies pures i és el segon tumor testicular prepubertal per darrera del carcinoma de sac vitel·lí representant el 14% d'aquests tumors. La majoria dels teratomes prepubertals són madurs i tenen un comportament clínic benigne independentment de la presència de components madurs o immadurs (Bahrami et al., 2007). De tots els TGTNS els teratomes són els únics que són intrínsecament refractaris al tractament amb quimioteràpia basada en cisplatí (CDDP) (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

1.4.2.3 Carcinomes de sac vitel·lí

El carcinoma de sac vitel·lí és la neoplàsia testicular més comuna en infants, i presenta taxes de curació molt elevades (Ross et al., 2002). Mentre que en aquesta població es presenta pràcticament en tots els casos en forma pura, en adults s'observa sempre en tumors mixtes i es troba present en el 40% de tots aquests tumors. Són tumors lobulats, blanquinosos, homogenis i amb una mucosa gelatinosa que els recobreix. Immunohistoquímicament són positius per l'AFP, encara que la tinció sovint és variable i irregular. La citoqueratina en canvi dóna una senyal intensa. Aquests tumors són positius per PLAP, i negatius per HCG i OCT3/4 (Bahrami et al., 2007).

1.4.2.4 Coriocarinomes

El coriocarcinoma pur és molt poc freqüent i representa menys de l'1% dels tumors testiculars, tot i així es troba en el 8% dels tumors mixtes. La franja d'edat on trobem els pacients amb coriocarcinoma és entre 20 i 40 anys. És la forma més agressiva dels TGTs degut a la seva gran capacitat d'invasió vascular i la majoria presenten disseminació i una elevada freqüència de metàstasis cerebrals; essent doncs el TGT amb pitjor pronòstic (McKendrick et al., 1991). El coriocarcinoma s'associa a valors d'HCG molt elevats en sèrum. Macroscòpicament el coriocarcinoma apareix com una massa hemorràgica sovint envoltada per un teixit blanquinós. Microscòpicament aquests tumors estan compostos per dos tipus cel·lulars, els sincitiotrofoblasts i els citotrofoblasts. Els sincitiotrofoblasts són cèl·lules multinucleades amb nuclis densos i citoplasmes grans, i els citotrofoblasts són més uniformes, de grandària mitjana, amb citoplasma abundant i mononucleades (Germà, 1991). Els coriocarcinomes són positius en immunohistoquímica per a HCG, sobretot en els sincitiotrofoblasts, per a la citoqueratina, i el 50% dels coriocarcinomes són positius per PLAP (Bahrami et al., 2007).

1.4.2.5 TGTs de components mixtes

Els TGTs de components mixtes són el segon TGT més comú en adults, seguint al seminoma. En aquests tumors els nivells en sèrum d'AFP i HCG acostumen a ser elevats (Bahrami et al., 2007).

Existeixen varies combinacions de components: quan hi ha presència de teratoma i carcinoma embrionari s'anomena teratocarcinoma, i representa el 28% dels pacients amb tumors mixtes; una altre combinació freqüent, que representa el 26% d'aquests

tumors, és el carcinoma embrionari i el carcinoma de sac vitel·lí (Germà, 1991). La freqüència en que es troben els diferents components esmentats en els tumors testiculars de components mixte són, per ordre els següents: carcinoma embrionari, teratoma, carcinoma de sac vitel·lí, seminoma i coriocarcinoma (Bahrami et al., 2007).

1.5 Tractament

El símptoma més clar del càncer testicular és la presència d'una massa testicular dura però indolora, que només apareix però en el 50% dels casos. Els pacients amb sospita de tumor testicular hauran de ser sotmesos a exàmens de palpació, ultrasonografia i determinació de marcadors tumorals; l'AFP i l'HCG, i en els pacients amb malaltia metastàtica es determina també la lactat deshidrogenassa (LDH). A part del seu valor pronòstic, la determinació d'aquests marcadors també serveix per fer un seguiment de la malaltia (Albers et al., 2011).

Els tractaments bàsics que s'administren en els tumors testiculars són la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia basada en CDDP, o una combinació d'aquests. El tractament inicial és l'orquiectomia radical, excepte els pacients amb metàstasi avançada que es tracten primer amb quimioteràpia fins assolir una estabilització clínica, i llavors es realitza la intervenció quirúrgica. El 80% dels pacients es curen amb aquesta cirurgia inicial, i després es sotmeten a diferents tractaments o a vigilància, segons el risc en cada individu (Winter and Albers, 2010).

Els seminomes es sotmeten a vigilància després de la cirurgia, encara que com a alternativa es pot administrar quimioteràpia o radioteràpia adjuvant, ja que les cèl·lules seminomatoses són extremadament radiosensibles (Kollmannsberger et al., 2006). En el cas dels TGTNS, si presenten invasió vascular es consideren tumors d'alt risc i post quirúrgicament s'apliquen tractaments quimioterapèutics. Mentre que si són de baix risc l'opció habitual després de l'orquiectomia és la vigilància, essent possible també la quimioteràpia adjuvant (Albers et al., 2011; Krege et al., 2008).

El tractament dels TGT metastàtics (TGTM) depèn de la histologia del tumor primari i del grup pronòstic. Els TGTM seminomatosos es poden tractar amb radioteràpia, però els TGTM no seminomatosos es tracten amb diferents combinacions quimioterapèutiques basades en CDDP ja que tenen més mal pronòstic (Schmoll et al., 2009a; Schmoll et al., 2009b). Mentre el 90% dels tumors seminomatosos es troben dins el grup de bon

pronòstic, en els tumors no seminomatosos aquest grup pronòstic només engloba el 55% dels casos. Els pacients amb tumors no seminomatosos de bon pronòstic o intermedi presenten taxes de supervivència als 5 anys del 80%, en canvi els de mal pronòstic presenten taxes del 45-50% (Albers et al., 2011).

Entre el 10 i el 30% dels pacients amb TGTM presenten una recaiguda després del tractament inicial. Hi ha dos tipus de recaigudes: les prematures, que apareixen abans de completar 2 anys després del tractament inicial i les recaigudes tardanes, que apareixen després de 2 anys de l'inici del tractament. També poden aparèixer malalties refractàries a CDDP, que són les que progressen durant el mateix tractament de CDDP o en les 4 setmanes posteriors. Les recaigudes tardanes i els tumors refractaris, encara que són les situacions menys comunes, representen un problema clínic greu degut a la resistència que mostren a la quimioteràpia (Koychev et al., 2011).

En les recaigudes tardanes el tractament prioritari és la cirurgia radical immediata de totes les lesions. En cas de no ser possible una resecció completa, es realitzen tractaments quimioterapèutics de rescat a dosis més elevades que en els tractaments inicials (Albers et al., 2011; Krege et al., 2008). La cirurgia en els pacients refractaris a CDDP presenta un 21-25% de supervivència lliure de malaltia a llarg termini. Per als pacients amb múltiples recaigudes o resistents a quimioteràpia després de tractaments a dosis elevades no hi ha tractaments estàndards, i s'han avaluat diversos agents amb bons resultats preclínics, però la majoria no ha presentat cap resposta clínica favorable (Koychev et al., 2011). Actualment es fan servir combinacions d'oxaliplatí, paclitaxel i gemcitabina, i s'ha observat que amb el tractament de l'oxaliplatí i la gemcitabina el 10-15% dels pacients, diagnosticats amb recaigudes múltiples o refractorietat a CDDP, aconsegueixen una supervivència a llarg termini (Oechsle et al., 2011b).

1.6 Resistència a CDDP

1.6.1 El CDDP

El CDDP, també conegut com *cis*-diamminedichloroplatinum II, va ser aprovat per la FDA (*Food and Drug Administration*) l'any 1978 per al tractament dels càncers de testicle i bufeta, i actualment és un compost que s'utilitza per combatre diferents neoplàsies com el càncer d'ovari, el colorectal, pulmó i cap i coll, entre d'altres (Lebwohl and Canetta, 1998). El CDDP va revolucionar la clínica dels TGTs ja que abans del seu descobriment el 95% dels homes diagnosticats amb TGTM morien (Einhorn and Donohue, 1977). Actualment és el tumor amb la taxa de supervivència més elevada; i mentre les taxes de supervivència a 5 anys en càncers metastàtics de pàncrees, pulmó o ronyó no supera el 10%, en els TGTM és del 80% (Masters and Koberle, 2003).

La citotoxicitat del CDDP afecta al fetge, als nervis perifèrics i l'oïda interna; però la seva principal limitació com a tractament antitumoral és l'elevada incidència de resistència al fàrmac. Aquesta resistència s'observa de manera intrínseca, en particular en els càncer colorectals, de pulmó o pròstata, o resistència adquirida, especialment en càncers d'ovari (Galluzzi et al., 2012).

A principis de la dècada dels anys 80 es va desenvolupar el carboplatí, un compost basat en platí de segona generació. Aquest, tot i que presentava menys efectes citotòxics que el cisplatí, presentava la mateixa resistència que el CDDP i els tumors resistents a CDDP tampoc responien a carboplatí (Lebwohl and Canetta, 1998). Més endavant, ja entrat al segle XXI es va desenvolupar l'oxaliplatí. Aquest presentava propietats farmacològiques diferents que el CDDP, tot i així alguns estudis clínics mostren que hi ha una resistència creuada d'ambdós fàrmacs (Stordal et al., 2007). D'altres compostos basats en platí han entrat en diferents fases clíniques, però no sembla que proporcionin millores davant el CDDP, el carboplatí o l'oxaliplatí (Galluzzi et al., 2012).

Així doncs el CDDP continua essent l'opció terapèutica més important, és per això que la resistència a aquest quimioterapèutic és un problema clínic greu i representa un front obert de lliuta en la investigació.

1.6.2 Mecanismes de resistència moleculars a CDDP

El CDDP actua unint-se covalentment al DNA i provocant diferents tipus de lesions. Aquestes lesions provoquen una aturada del cicle cel·lular, que permet que els mecanismes de reparació restableixin la integritat del DNA i prevé de mitosis anormals. Quan el dany al DNA queda per reparar, les cèl·lules moren majoritàriament per apoptosi (Chu, 1994).

S'ha observat que les cèl·lules resistents a CDDP presenten alteracions que es poden classificar segons si tenen lloc abans, durant o després de la unió del CDDP al DNA, o si són independents a aquest fet (Galluzzi et al., 2012; Koberle et al., 2010).

1.6.2.1 Mecanismes de resistència previs a la unió a DNA

Els mecanismes pels quals les cèl·lules poden eludir l'efecte de CDDP abans que s'uneixi al DNA poden ser principalment la reducció de l'acumulació intracel·lular de CDDP, adoptant canvis en l'absorció o el flux de sortida; i el segrest o la inactivació intracel·lular de CDDP.

Com a mecanismes d'entrada del CDDP a la cèl·lula s'ha suggerit, i de manera addicional a la difusió passiva, la participació de transportadors de membrana. S'ha vist que el transportador de membrana CTR1 està involucrat en l'absorció de CDDP, i s'ha observat una infra regulació en cèl·lules resistents a CDDP (Holzer et al., 2006; Katano et al., 2002).

En referència al segon mecanisme descrit s'ha vist que la resistència a CDDP pot venir deguda a l'augment de la inactivació intracel·lular del fàrmac per molècules amb grups tiol, com el glutatió i les metalotioneïnes. Tot i que s'han observat evidències preclíniques de que aquests mecanismes es troben alterats en cèl·lules resistents, no s'ha confirmat una evidència clínica d'aquests processos (Koberle et al., 2010).

1.6.2.2 Mecanismes de resistència en la unió a DNA

Les cèl·lules resistents a CDDP sovint tenen l'habilitat de reparar les lesions produïdes en el DNA o presenten una major tolerància a aquestes lesions no reparades. La majoria de les lesions al DNA són reparades pel sistema de reparació d'excisió de

nucleòtids (NER) i diversos estudis indiquen correlació entre l'eficient activitat de NER i resistència a CDDP (Bellmunt et al., 2007; Furuta et al., 2002; Metzger et al., 1998). Les lesions al DNA també poden ser detectades, encara que no reparades, pel sistema *mismatch repair* (MMR), i la deficiència en les proteïnes involucrades en el MMR també està involucrada en la resistència a CDDP (Fink et al., 1998).

Quan les lesions al DNA no es reparen existeix un mecanisme que permet tolerar aquestes lesions, la síntesi translesió (TLS). En aquest mecanisme hi són involucrades un grup de polimerases de DNA especialitzades i capaces de sobrepassar les lesions no reparades al DNA. Depenent del tipus de lesió actuaran unes polimerases o unes altres, i en les lesions produïdes per CDDP hi actuen sobretot la POLH i la REV3-REV7. La sobreexpressió de la POLH es correlaciona amb menor supervivència en pacients de NSCLC (tumors de pulmó de cèl·lula no petita) tractats amb CDDP, i la sobreexpressió de la REV s'ha associat a resistència a CDDP *in vitro*. (Galluzzi et al., 2012; Shachar et al., 2009).

1.6.2.3 Mecanismes de resistència posteriors a la unió a DNA

Aquests mecanismes engloben totes les alteracions i defectes en la maquinària executòria de mort cel·lular, o bé en les vies de senyalització que en condicions normals activarien mecanismes apoptòtics en resposta al dany en el DNA. A continuació repassarem els més rellevants.

Un dels mecanismes més importants és la inactivació de la proteïna supressora de tumors p53, que juga un paper important en la via proapoptòtica en resposta al dany al DNA causat per CDDP. Les lesions al DNA activen les cinases ATM (proteïna mutada atàxia telangiectàsia) i ATR (proteïna relacionada de RAD3, un sensor de dany al DNA) que fosforilen p53. Els gens activats a conseqüència de l'activació de p53 indueixen l'aturada del cicle cel·lular en les fases G1 o G2/M; la reparació de dany al DNA i l'apoptosi (Siddik, 2003).

Estudis clínics mostren que els pacients amb la proteïna salvatge p53 tenen més probabilitats de beneficiar-se del tractament amb quimioteràpia basada en CDDP com és el cas dels tumors d'ovari (Gadducci et al., 2002). *In vitro* s'ha vist que línies cel·lulars de diferents orígens amb p53 mutada presenten més resistència a CDDP, que línies

amb la proteïna salvatge; i que la inactivació de p53 sensibilitza les cèl·lules a l'agent quimioterapèutic (Branch et al., 2000; Hawkins et al., 1996; O'Connor et al., 1997).

La inducció apoptòtica de CDDP està vinculada a l'increment de la ràtio entre Bax:Bcl-2, una proteïna proapoptòtica i una antiapoptòtica respectivament. CDDP indueix un augment de Bax, però per altra banda també pot induir una escissió de Bcl-2, augmentant en ambdós casos la ràtio Bax:Bcl-2 (Siddik, 2003). *In vitro* s'ha observat que la deficiència de Bax o la sobreexpressió de Bcl-2 aporten resistència a CDDP. A més a més s'han pogut relacionar clínicament els nivells de Bcl-2 amb resistència a CDDP i recurrència del tumor en varis tipus de malignitats com ovari, cap i coll i NSCLC (Galluzzi et al., 2012).

Alguns estudis preclínic suggereixen que podrien estar involucrats en la resistència a CDDP altres transductors de les senyals proapoptòtiques com els membres de la família de les MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (veure apartat 2.3.2 de la introducció). Encara que el rol de les MAPK en la resistència a CDDP no està clara, i és que s'ha vist que pot influir en ambdues direccions (Brozovic and Osmak, 2007).

Les MAPK regulen processos cel·lulars de supervivència cel·lular, proliferació, diferenciació o apoptosi. En les cèl·lules de mamífers existeixen tres grups de MAPK: les cinases c-Jun N-terminal (JNKs o SAPKs), les cinases p38 i les cinases reguladores de senyals extracel·lulars (ERKs) (Santarpia et al., 2012). El rol de les MAPK promovent la mort cel·lular o la supervivència en resposta a CDDP pot dependre segons el tipus cel·lular o segons el tipus de MAPK activada. Mentre que p38 juga el paper de promoure mort cel·lular i l'activació de JNK mostra un rol proapoptotic, encara que puntualment també s'ha observat l'activació de vies de supervivència, s'ha vist que ERK pot induir les dues vies (Brozovic and Osmak, 2007). Així per exemple s'ha observat com l'activació d'ERK redueix la sensibilitat a CDDP en cèl·lules tumorals d'ovari (Persons et al., 1999), mentre que en cèl·lules de tumor de cèrvix, l'activació d'ERK s'ha descrit que indueix l'apoptosi provocada per CDDP (Wang et al., 2000). La inhibició de JNK, p38 o ERK s'ha observat associada a ambdós fenotips, sensibles i resistents a cisplatí, i cap rellevància clínica ha estat descrita (Brozovic and Osmak, 2007; Galluzzi et al., 2012).

1.6.2.4 Mecanismes de resistència independents a la unió a DNA

L'alteració de vies de senyalització, encara que no estiguin involucrades en els processos cel·lulars generats per CDDP, poden compensar les senyals letals induïdes pel fàrmac i ajudar a mantenir el fenotip resistent. En aquests mecanismes es poden incloure desregulacions i alteracions en les vies de senyalització implicades en supervivència, proliferació, apoptosi o cicle cel·lular.

Un exemple és l'amplificació o la sobreexpressió del receptor tirosina cinasa ErbB2 que s'associa a resistència a CDDP en pacients de NSCLC (Fijolek et al., 2006), i el 20-30% dels tumors de mama i ovari sobreexpressen ErbB2, presentant poca resposta al tractament amb CDDP (Hengstler et al., 1999; Slamon et al., 1989). De la mateixa manera s'ha vist associada la sobreexpressió d'ErbB1/EGFR (*epidermal growth factor receptor*) a la quimioresistència i mal pronòstic en tumors d'ovari (Itamochi et al., 2012). L'activació d'aquests receptors indueix dues grans cascades de transducció: una que activa la via de ERK, que com ja hem comentat podria estar relacionada amb la resistència a CDDP, i per altra banda s'activa la via de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT (veure apartat 2.3.1 i 2.3.2 de la introducció) (Hynes and MacDonald, 2009).

La via PI3K/AKT és una important via que regula processos biològics tan fonamentals com la supervivència cel·lular, proliferació, apoptosi, metabolisme cel·lular, migració i angiogènesi entre d'altres (Manning and Cantley, 2007). La seva desregulació i activació constitutiva s'ha observat en cèl·lules tumorals a través de diversos mecanismes, així com també s'ha observat que la seva activació promou resistència al tractament tant amb radioteràpia, quimioteràpia com teràpies dirigides (Siddik, 2003).

S'ha observat sobreexpressió d'AKT en cèl·lules de pulmó amb resistència adquirida a CDDP, on l'expressió d'un dominant negatiu n'incrementa la sensibilitat, i l'expressió ectòpica d'AKT en les parentals incrementa la resistència al quimioterapèutic (Liu et al., 2007). Per altra banda s'ha descrit també que CDDP pot induir l'activació d'AKT en diverses línies cel·lulars (Huang and Hung, 2009).

Una altra via que s'ha descrit que la seva desregulació pot afavorir quimioresistència és la via de NF- κ B (nuclear factor of κ B). Els factors de transcripció NF- κ B es transloquen al nucli en resposta a activadors com TNF α (factor de necrosi tumoral α) o algunes caspases. NF- κ B regula l'expressió de gens antiapoptòtics, com les proteïnes

inhibidores d'apoptosi (IAPs) o proteïnes homologues de Bcl-2. Paradoxalment NF- κ B també indueix la transcripció de molècules proapoptòtiques com Fas i FasL (CD95). Les cèl·lules que expressen NF- κ B activat constitutivament són resistents a diversos agents quimioterapèutics, i també és activat per CDDP (Pommier et al., 2004).

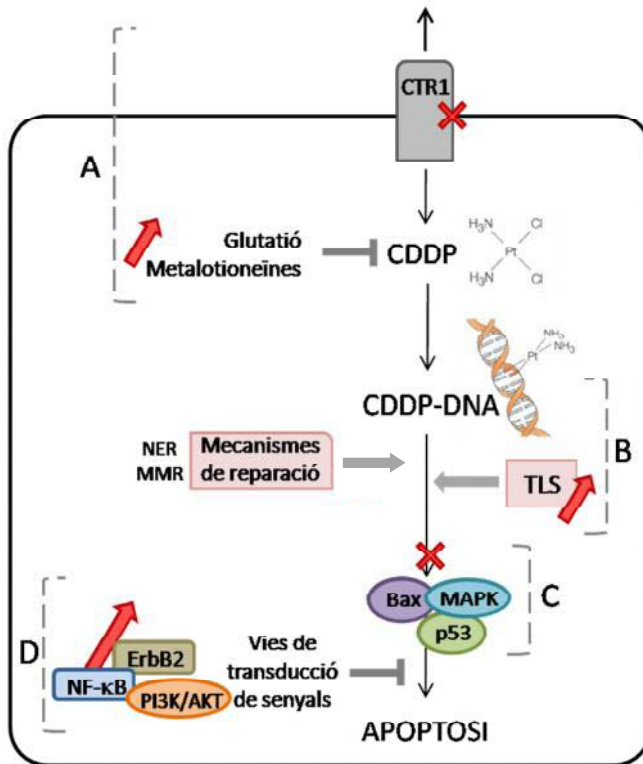


Figura 13. Mecanismes moleculars de resistència a CDDP. En aquesta figura es troben resumits els mecanismes més destacats en la resistència a CDDP comentats anteriorment. **A)** Mecanismes previs a la unió a DNA que redueixen la presència de CDDP intracel·lular: la infraexpressió del transportador de membrana CTR1 que redueix l'entrada de CDDP; augment de les molècules amb grups tiol que inactiven el CDDP intracel·lular. **B)** Els mecanismes de resistència involucrats en la unió al DNA consisteixen en alteracions en els sistemes de detecció i reparació de les lesions al DNA, com NER o MMR; o l'augment de tolerància a la presència de lesions al DNA augmentant l'activitat de les polimerases involucrades en el TLS. **C)** Els mecanismes de resistència posteriors a la unió al DNA engloben les alteracions en la maquinària executòria de mort cel·lular o en les vies de senyalització que activen els mecanismes apoptòtics. Les més rellevants són la inactivació de la proteïna supressora tumoral p53; alteració de la ràtio Bax:Bcl-2 inhibint Bax o sobreexpressant Bcl-2; i l'alteració de la via de les MAPK també pot bloquejar l'apoptosi induïda per CDDP. **D)** Els mecanismes de resistència independents a la unió de CDDP al DNA consisteixen en alteracions en les vies de senyalització que poden compensar les senyals letals induïdes per CDDP i ajudar a mantenir el fenotip resistent. Algunes de les alteracions descrites són la sobreexpressió d'ErbB1 o ErbB2; l'activació de la via de PI3K/AKT o l'activació de NF- κ B.

1.6.3 Resistència a CDDP en TGTs

Des que es va implantar la quimioteràpia basada en CDDP com a tractament estàndard per als TGTs no s'ha realitzat cap canvi en la primera línia de tractament, i el 10-20% dels pacients amb TGTs presenten respostes no complertes o recaigudes. Els pacients que tenen una recaiguda després de la primera línia de quimioteràpia basada en CDDP tenen mala prognosi, encara que fins un 20-25% d'aquests pacients es curen amb una segona línia de quimioteràpia basada en cisplatí i paclitaxel (Piulats et al., 2009).

Els TGTs són excepcionalment sensibles a la quimioteràpia basada en CDDP, i a diferència d'altres tumors, amb aquest tractament es curen un 80% dels pacients de TGTs (Bosl and Motzer, 1997). La hipersensibilitat de les cèl·lules de TGTs a CDDP ha estat relacionada a una hipersensibilitat intrínseca d'aquestes cèl·lules als agents de dany al DNA (Masters et al., 1993), encara que recentment s'han realitzat estudis que relacionen una hipersensibilitat de les funcions proapoptòtiques de p53 com a únic mecanisme de la resposta apoptòtica de les cèl·lules de TGTs a CDDP. Gutekunst *et al.* (Gutekunst et al., 2011) han mostrat com el silenciament de p53 per un *small-interfering RNA* (siRNA) és suficient per anul·lar la hipersensibilitat a CDDP en una línia cel·lular de TGTs. A més a més els TGTs són uns dels pocs tumors on no només p53 rarament es troba mutada sinó que es troba en nivells més elevats del normal (Guillou et al., 1996; Peng et al., 1993). Malgrat l'elevada sensibilitat a CDDP, tal i com hem comentat anteriorment, també apareixen malalties refractàries i resistents al tractament quimioterapèutic.

Alguns dels mecanismes de resistència descrits anteriorment s'han descrit implicats en TGTs. En referència als mecanismes de resistència previs a la unió del CDDP al DNA s'ha observat per una banda, que en cèl·lules de TGTs els nivells elevats de glutatió i metalotioneïnes estan involucrats en la resistència a CDDP, però per l'altra alguns estudis han observat una correlació inversa entre la resistència i presència de metalotioneïnes. Sembla ser que els tumors més invasius presentarien nivells més baixos de molècules amb grups tiol, però a falta de més evidències no es podria parlar com a mecanisme comú de resistència a CDDP en TGTs .

Pel que fa a la capacitat de reparació de les lesions al DNA produïdes per CDDP, les cèl·lules de TGTs presenten precisament un rendiment molt baix de NER, essent així una característica de la hipersensibilitat a CDDP (Piulats et al., 2009). Pel que fa a la maquinària de MMR, s'ha observat que TGTs resistents a CDDP presenten més

incidència d'instabilitat de microsatèl·lits, efecte generat per un defecte en el sistema MMR (Honecker et al., 2009).

La resistència a CDDP també pot venir donada per l'alteració de les proteïnes reguladores de l'apoptosi Bax o Bcl-2, entre d'altres. En cèl·lules de TGTs s'ha observat que una incrementada sensibilitat a l'etopòsid (la segona droga més usada en aquests pacients després de CDDP) estava relacionada amb una ràtio elevada de Bax:Bcl-2. Tot i així a aquesta relació no se li ha atribuït rellevància clínica ni s'ha observat respecte CDDP (Piulats et al., 2009). Per altra banda s'ha observat que CDDP induïx en cèl·lules sensibles l'expressió de Noxa (activador de l'oxidació de NADPH) necessària per activar l'apoptosi induïda per el fàrmac de manera independent a p53. L'expressió de Noxa a més a més s'ha correlacionat amb la bona prognosi de pacients de TGT de carcinoma embrionari (Grande et al., 2012).

Diversos estudis relacionen l'activació de MEK/ERK amb la sensibilitat a l'apoptosi induïda pel CDDP en cèl·lules de TGTs. Schewyer *et al.* associen l'activació de MEK/ERK induïda per CDDP amb l'activació de la caspasa 3, i també observen l'efecte contrari, com la inhibició d'ERK redueix els nivells d'apoptosi induïts per CDDP (Schweyer et al., 2004). Per altra banda Fung *et al.* (Fung et al., 2006) també descriuen un rol de MEK/ERK com a sensibilitzador a l'apoptosi induïda per CDDP en cèl·lules de TGTs però implicant MAD2 (*mitotic arrest deficient-2*), un regulador de la mitosi, de manera que la inhibició de MAD2 provoca una pèrdua d'activitat de MEK/ERK i es correlaciona amb resistència a CDDP.

2. RECEPTORS TIROSINA CINASA

Els receptors tirosina cinasa (RTK, de l'anglès *receptor tyrosine kinase*) es van descobrir fa més de 25 anys i des de llavors molts RTKs es consideren claus en la regulació de processos crítics per a la cèl·lula, ja que són els que transferiran els estímuls externs en cascades de transducció de senyals intracel·lulars, desencadenant canvis en l'activitat cel·lular (Berridge, 2012).

Es coneixen 58 RTKs en humans, classificats en 20 subfamílies. Els RTKs tenen totes estructures moleculars molt semblants que es caracteritzen per la presència a N-terminal d'un domini d'unió al lligand a la regió extracel·lular; un domini α transmembrana; i a C-terminal, la regió citoplasmàtica que conté el domini tirosina cinasa (Lemmon and Schlessinger, 2010).

Els lligands activen els receptors induint la dimerització de les regions extracel·lulars dels receptors. Com aquesta dimerització condueix a l'activació del domini tirosina cinasa encara no està clar del tot, i malgrat l'elevada conservació de l'estructura dels RTKs, sembla que aquests mecanismes són diferents entre receptors. Les mutacions o les activitats aberrants dels RTKs s'han associat a tumors, diabetis, inflamació, alteracions d'ossos, arteriosclerosi i angiogènesi (Lemmon and Schlessinger, 2010).

2.1 Receptors ErbBs

2.1.1 Família de receptors ErbBs

La família dels receptors tirosina cinasa ErbBs té quatre components: ErbB1, també conegut com EGFR (*epidermal growth factor receptor*); ErbB2 o Neu/HER2; ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4). La unió del lligand indueix l'homodimerització o l'heterodimerització d'aquests receptors activant els seus dominis tirosina cinasa intracel·lulars i iniciant múltiples cascades de vies transductores de senyalització intracel·lular (Hynes and Lane, 2005).

La regió extracel·lular d'aquests receptors està composta de quatre dominis, I-IV: on el domini I i el domini III participen en la unió del lligand, i el domini d'interacció receptor-receptor és el domini II, de manera que amb la unió del lligand els receptors realitzen un

canvi de conformació on el domini II queda més descobert i poden interaccionar amb altres receptors (Figura 14) (Hynes and Lane, 2005). Cal destacar dues anomalies funcionals dins la família de receptors ErbBs. Per una banda ErbB2 té una conformació fixa de la regió extracel·lular on el domini II està exposat i per això manca de capacitat d'unió a lligand (Garrett et al., 2003). Aquesta estructura també és consistent amb el fet que ErbB2 és el company preferit pels altres receptors ErbBs (Graus-Porta et al., 1997). L'altre anomalia és la falta d'activitat dels domini tirosina cinasa d'ErbB3, degut a que determinats aminoàcids fonamentals per a la seva funció es troben alterats (Berger et al., 2004). Ambdós receptors han d'heterodimeritzar amb altres receptors de la família per activar la senyalització intracel·lular (Figura 15).

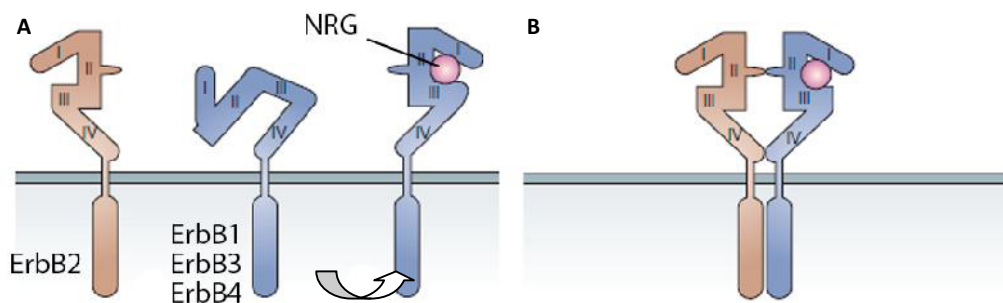


Figura 14. **Conformació estructural dels receptors ErbBs en la unió del lligand i dimerització.** A) ErbB2 té una conformació fixa que impedeix la unió a lligand i el fa la parella preferida per als altres receptors. Els altres tres receptors, per la unió dels lligands, pateixen un canvi en la conformació estructural (B) que deixa al descobert el domini II amb el que dimeritzen amb els altres receptors. Figura adaptada de *Hynes and Lane, Nat.Rev.2005* (Hynes and Lane, 2005).

La família de lligands d'EGF (*epidermal growth factor*) es pot dividir en tres grups, segons al receptor amb qui s'uneixen. EGF, TGF- α (de l'anglès, *transforming growth factor α*) i AR (amfiregulina) s'uneixen específicament a ErbB1. El segon grup el constitueixen els lligands que poden unir-se a ErbB1 i a ErbB4: BTC (betacel·lulina), HB-EGF (*heparin-binding EGF*) i l'EPR (epiregulina). L'últim grup és format per les neuregulines (NRGs), on NRG1 i NRG2 poden unir-se a ErbB3 i ErbB4, i NRG3 i NRG4 només a ErbB4 (Figura 15) (Hynes and Lane, 2005).

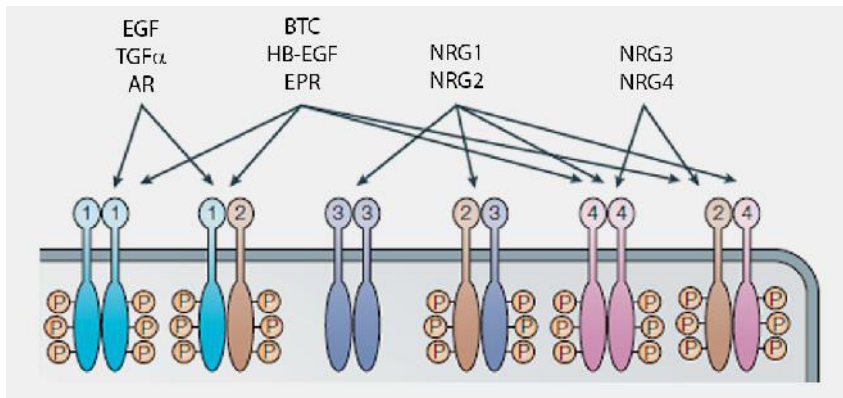


Figura I5. Homodimeritzacions i heterodimeritzacions dels receptors ErbBs i els seus lligands. Figura adaptada de *Hynes and Lane, Nat.Rev.2005* (Hynes and Lane, 2005).

Les principals vies de transducció de senyals activades pels receptors ErbBs són la via de RAS/ERKs, la via del fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K/AKT) i la via de transducció i activació de transcripció STAT, totes responsables de regular el metabolisme, el creixement i la supervivència cel·lular (Figura I6). Els residus de tirosina fosforilats dels receptors actius proporcionen llocs d'anclatge a diverses proteïnes i cada receptor mostra un patró diferent d'aquestes proteïnes a reclutar. I encara que al final tots activen les mateixes vies de transducció de senyals, sí que ho poden fer de manera diferent i mostrant afinitats diferents. Així doncs ErbB1, activa la via de STAT3 i tot i no unir-se a p85 activa la via PI3K/AKT mitjançant GAB1. El receptor ErbB2 activa la via d'ERKs unint-se sobretot a GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), SHC i CRK; i ErbB3 conté sis punts d'unió a la subunitat de PI3K p85, essent aquesta la via preferencial activada per aquest receptor (Hynes and Lane, 2005).

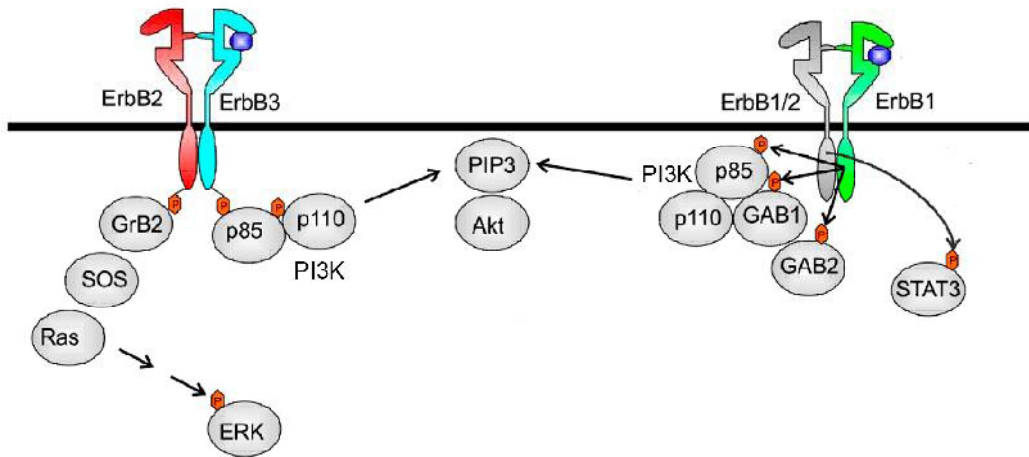


Figura 16. Principals vies de transducció de senyals en resposta als receptors ErbBs.
 Figura adaptada de *Hervent and Keulenaer, Int.J.Mol.Sci 2012*. (Hervent and De Keulenaer, 2012)

2.1.2 ErbBs i càncer

L'alteració de la senyalització dels receptors ErbBs s'ha vist implicada en el desenvolupament de varis tipus diferents de tumors, convertint aquesta família de receptors en una de les dianes més estudiades en oncologia clínica.

Alteracions genètiques com l'amplificació gènica conduint a una sobreexpressió del receptor o mutacions activadores del domini cinasa dels receptors s'han descrit sobretot en ErbB1 (Ohgaki et al., 2004; Sunpaweravong et al., 2005), però també en ErbB2, on està extensament descrita la seva sobreexpressió en un 20% dels tumors de mama esporàdics, i en pacients de tumor d'ovari, carcinoma gàstric o de les glàndules salivals (Baselga and Swain, 2009; Cornolti et al., 2007; Slamon et al., 1987; Vermeij et al., 2008). Fins i tot s'ha descrit una activació constitutiva d'ErbB1 deguda a la producció per part de les cèl·lules tumorals o estromals del lligand EGF (Salomon et al., 1995). En alguns tumors l'expressió aberrant d'ErbB1 o ErbB2 s'associa a una baixa prognosi i resistència a teràpies convencionals (Hynes and MacDonald, 2009).

ErbB3, tot i mancar-li l'activitat tirosina cinasa s'ha observat que és el receptor que més senyalitza via PI3K/AKT i també s'ha vist involucrat en tumorigènesi (Hynes and Lane, 2005). A més a més el dímer que forma amb ErbB2 és crucial en els tumors on s'amplifica ErbB2 i s'ha descrit que aquest és el dímer de receptors ErbBs més actiu (Baselga and Swain, 2009). Holbro *et al.* descriuen com la pèrdua d'ErbB3 provoca la

pèrdua de la funció oncogènica d'ErbB2 en cèl·lules de mama que sobreexpressen aquest receptor, provocant els mateixos efectes que la pèrdua d'ErbB2, indicant que ErbB2 i ErbB3 funcionen com una unitat oncogènica (Holbro et al., 2003).

ErbB4 és el receptor de la família menys descrit en tumorigènesi, i de fet hi ha estudis que l'hi atribueixen un paper de supressor tumoral i d'altres d'activitat oncogènica. Mentre que la seva expressió és absent en tumors tant agressius com pròstata o pàncrees i s'ha associat a bona prognosi en càncers de cèrvix o ovari, s'ha observat sobreexpressió en melanomes i tumors de pulmó afavorint la proliferació, i en mama té activitat oncogènica juntament amb ErbB2 (Lee et al., 2005; Mill et al., 2011; Naresh et al., 2006; Rudloff and Samuels, 2010; Thybusch-Bernhardt et al., 2001).

No només les mutacions genètiques en el propi receptor poden alterar la seva regulació, provocant una activació constitutiva d'aquests, sinó que també existeixen mecanismes de transactivació que poden conduir a aquesta situació. Un dels més rellevants involucra a les proteïnes G associades a receptor (GPCRs), que estimulen les metaloproteases encarregades del processament dels precursors dels lligands de la família d'EGF induint en conseqüència l'activació del receptor (Daub et al., 1996; Hynes and Lane, 2005).

2.1.3 Teràpies dirigides a receptors ErbBs

Les teràpies dirigides, davant de la quimioteràpia convencional, aporten més selectivitat per a les cèl·lules canceroses i redueixen els efectes secundaris, i en alguns tumors ja s'han convertit en la primera línia de tractament (Arora and Scholar, 2005). Degut a que els receptors ErbBs es troben activats de manera aberrant en múltiples tumors humans, s'han convertit en candidats excel·lents per a les teràpies antitumorals dirigides. En models preclínics el tractament de les cèl·lules tumorals amb teràpies dirigides a receptors ErbBs afecta bloquejant les vies de PI3K/AKT, ERKs i STAT, i en conseqüència inhibeix la proliferació de línies cel·lulars i el creixement de tumors xenògrafs (Hynes and Lane, 2005).

Existeixen dos tipus d'inhibidors de receptors tirosina cinasa: el anticossos monoclonals (mAb) que s'uneixen al lligand impeding la unió d'aquest o als dominis extracel·lulars dels receptors, impeding la dimerització; i les petites molècules inhibidores de tirosina cinases (TKI) que inhibeixen l'activitat tirosina cinasa del domini intracel·lular dels receptors (Figura I7) (Baselga and Swain, 2009). Els TKIs són menys específics que els

mAbs, aportant més avatges en potència d'inhibició, ja que a una mateixa concentració en plasma poden inhibir més vies de senyalització. Tot i així també presenten més efectes secundaris que els mAbs. Un dels efectes secundaris més comuns és la diarrea, i també s'ha descrit que poden presentar cardiotoxicitat i el símptoma més greu descrit és la pneumonitis que s'ha relacionat en algun cas amb gefitinib (Hervent and De Keulenaer, 2012).

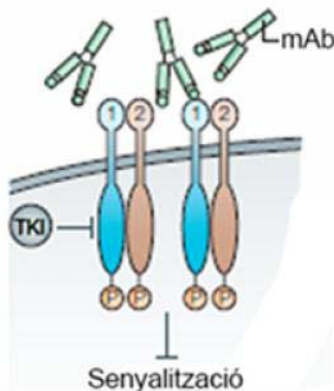


Figura 17. Existeixen dos tipus d'inhibidors dels RTKs; els anticossos monoclonals (mAb) i les petites molècules inhibidores dels dominis tirosina cinasa (TKI) Figura adaptada de *Hynes 2005 Nat.Rev.2005* (Hynes and Lane, 2005).

La FDA actualment té aprovats diversos tractaments amb inhibidors dels receptors ErbBs, tant anticossos monoclonals com TKIs (veure taula I2).

Un d'ells és **Cetuximab**, un anticòs monoclonal que bloqueja el domini d'unió a lligand del receptor ErbB1. Està aprovat per al tractament dels pacients amb càncer colorectal metastàtic (CRCm) refractaris al quimioterapèutic irinotecan i per als tumors de cap i coll escamosos, en combinació amb radioteràpia. (Hynes and Lane, 2005; NCI, [updated 7/2012-cited 4/2013]). **Panitumumab** és un anticòs monoclonal que bloqueja la unió d'EGF i TGF- α al receptor ErbB1, i està aprovat per al tractament de pacients de CRCm ErbB1 positius, després de tractaments quimioterapèutics (NCI, [updated 1/2011-cited 4/2013]-b).

Gefitinib i erlotinib estan indicats per al tractament de tumors NSCLC que presenten mutacions en ErbB1. Les cèl·lules tumorals que duen la mutació en el receptor esdevenen dependents de la senyalització d'aquest receptor, el que s'anomena addicció oncogènica (Weinstein, 2002), i conseqüentment són més sensibles als tractaments inhibitoris del receptor (Takeuchi and Ito, 2010). Com a conseqüència de la inhibició del receptor amb gefitinib es bloquegen les vies de proliferació i supervivència cel·lular ERK1/2 i AKT (Janmaat et al., 2003) i s'activen diversos mecanismes proapoptòtics. La inducció de l'apoptosi és el mecanisme majoritari de l'acció antitumoral de gefitinib; però

l'inhibidor d'ErbB1 també inhibeix el creixement cel·lular aturant les cèl·lules en les fases G₀/G₁ del cicle cel·lular (Takeuchi and Ito, 2010).

	Nom	Dianes	Indicació de la FDA i any d'aprovació
mAbs	Cetuximab (Erbbitux [®])	ErbB1	CRCm ErbB1+ refractaris a irotscan (2004) Càncer de cap i coll escamós en combinació amb radioteràpia (2006)
	Panitumumab (Vectibix [®])	ErbB1	CRCm ErbB1+ amb progressió després de quimioteràpies (2006)
	Trastuzumab (Herceptin [®])	ErbB2	Càncer de mama metastàtics ErbB2+ (1998) Càncer gàstric o de gastro-esòfag (2010)
	Pertuzumab	ErbB2	Càncer de mama metastàtics ErbB2+ en combinació amb trastuzumab i docetaxel (2012)
TKIs	Gefitinib (Iressa [®])	ErbB1	NSCLC metastàtic després de quimioteràpia (2003)
	Erlotinib (Tarceva [®])	ErbB1	NSCLC en monoteràpia després de primera línia de quimioteràpia (2004) Càncer de pàncrees avançat en combinació amb gemcitabina (2005)
	Lapatinib (Tykerb [®])	ErbB1 ErbB2	Primera línia en càncer de mama metastàtic ErbB2+ en combinació amb letrozole (2010) Càncer de mama metastàtic ErbB2+ en combinació amb capecitabina. (2007)
	Vandetanib (Zactima [®])	ErbB1 VEGFR2 RET	Càncer de tiroides metastàtic (2011)

Taula I2. Inhibidors dels receptors ErbBs aprovats per ús clínic per la FDA.

Un altre TKI que inhibeix ErbB1, és **lapatinib**, però bloqueja de manera dual ErbB1 i ErbB2 (Wood et al., 2004). Aquest fàrmac es va aprovar per la FDA, el 2007, per tractar, en combinació amb capecitabina, pacients de càncer de mama avançat o metastàtic que sobreexpressaven ErbB2 i ja havien rebut tractaments d'antraciclina, taxà i trastuzumab. El 2010 la FDA va aprovar el tractament de lapatinib combinat amb letrozole, un inhibidor de l'aromatasa, com a tractament de primera línia en pacients postmenopàusiques amb tumor de mama positiu per ErbB2 (NCI, [updated 1/2011-cited 4/2013]-a). Lapatinib funcionaria en pacients resistent a trastuzumab, degut a que la resistència vindria ocasionada per la presència de receptors amb el domini extracel·lular

truncat, de manera que lapatinib podria bloquejar l'activitat mentre que l'anticòs monoclonal no. Aquest fet a més a més evidenciaria que el receptor truncat seria un potent oncogen (Baselga and Swain, 2009).

Recentment la FDA ha aprovat també **vandetanib**, un inhibidor també múltiple que bloqueja ErbB1, VEGFR2 i el receptor tirosina cinasa RET, per tractar pacients adults de tumor metastàtic de tiroides que no poden ser operats (FDA, [uptadet 6/2011-cited4/2013]).

Trastuzumab és un dels anticossos monoclonals més actius, i s'uneix al domini IV de la regió extracel·lular d'ErbB2 (Figura I4). Existeixen evidències preclíniques que aquest anticòs bloqueja el creixement de cèl·lules tumorals on la proliferació és regulada pel dímer ErbB2/ErbB3, i a part de l'activitat bloquejant de la senyalització del receptor hi ha evidències que trastuzumab també induiria citotoxicitat a la cèl·lula (Baselga and Swain, 2009). Trastuzumab està aprovat des del 1998 per la FDA per al tractament de càncer de mama metastàtic positiu per a ErbB2, ha mostrat tenir un impacte molt significatiu en la supervivència d'aquests pacients i actualment ja està aprovat també com a monoteràpia. Més recentment s'ha aprovat el seu ús per als tumors metastàtics gàstrics o de gastro-esòfag en combinació amb quimioteràpia (FDA, [updated 2/2013-cited 4/2013]).

Pertuzumab és un altre anticòs monoclonal contra ErbB2, però aquest s'uneix al domini II de la regió extracel·lular del receptor (veure figura I4) que és el domini de dimerització d'ErbB2 amb altres receptors. Mentre trastuzumab trenca els heterodímers ErbB2/ErbB3 formats, independents de lligand (Junttila et al., 2009), pertuzumab bloqueja la formació del dímer dependent de lligand (Wehrman et al., 2006). Pertuzumab es va aprovar recentment per la FDA per al tractament de pacients de càncer de mama metastàtics ErbB2 positius que no han rebut quimioteràpia, en combinació amb trastuzumab i docetaxel (FDA, [updated 6/2012-cited 4/2013]).

De moment tots els inhibidors dels receptors ErbBs amb ús clínic estan dirigits a ErbB1 i ErbB2, malgrat s'ha descrit àmpliament que ErbB3 juga un paper important en senyalització oncogènica, encara no hi ha inhibidors aprovats per la FDA dirigits a ErbB3 o ErbB4. Tot i que sí que existeixen anticossos monoclonals que bloquegen ErbB3 en estudis preclínics (McDonagh et al., 2012; Schoeberl et al., 2009), i alguna fase clínica que assaja l'ús d'alguns d'aquests anticossos monoclonals en tumors d'ovari o pulmó

(www.clinicaltrials.org, Website Updated 2012 Aug., cited 2013 Mar.18. cited 2013 Mar.18., cited 2013 Mar.18., cited 2013 Mar.18.).

2.1.4 ErbBs i tumors germinals testiculars

Pel que fa al paper dels receptors ErbBs en els TGTs, s'ha observat expressió d'ErbB1 i ErbB2, encara que la rellevància clínica que podrien tenir no queda clara. Moroni *et al.*, van ser dels primers en descriure la presència d'ErbB1 en tumors testiculars no seminomatosos. Van veure expressió d'ErbB1 en cèl·lules positives per HCG i van observar expressió d'ErbB2, TGF- α i pEGFR (el receptor fosforilat) en un 25, 36 i 27% de tumors primaris no seminomatosos positius per ErbB1 (Moroni et al., 2001). Hechelhammer *et al.* també van observar expressió d'ErbB1 en les cèl·lules sinciotrofoblàstiques, positives per HCG, així com també en cèl·lules estromals de carcinomes embrionaris i en components epitelials de teratomes (Hechelhammer et al., 2003). També s'ha observat expressió d'ErbB1 en un grup significatiu de tumors no seminomatosos refractaris a la quimioteràpia (Madani et al., 2003).

Encara que també existeixen altres estudis que treuen rellevància a l'expressió d'ErbB1 en els tumors testiculars. És així que Kollmannsberger *et al.* no obtenen cap rellevància en l'expressió d'ErbB1 ni d'ErbB2 en mostres de pacients resistents a CDDP. Però que utilitzen mostres d'origen primari, a diferència de a Madani *et al.*, que fan servir mostres metastàtiques. Alguns anàlisis no han trobat amplificació d'ErbB2 en TGTs (Pfister et al., 2010), d'altres en canvi observen expressió d'ErbB1 i ErbB2 en TGTs no seminomatosos però sense correlació amb l'estat o prognosi clínic (Duran et al., 2010; Ghavamnasiri et al., 2010).

Així doncs tot i els estudis que descriuen expressió d'ErbB1 i ErbB2, i la implicació d'aquests receptors en el desenvolupament de les cèl·lules germinals testiculars (Toyoda-Ohno et al., 1999; Wahab-Wahlgren et al., 2003), la contribució dels receptors ErbBs en la tumorigènesi dels TGTs no queda clara.

2.2 Receptors dels factors de creixement derivats de plaquetes (PDGFRs)

2.2.1 Família de receptors PDGFRs

La família de receptors del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR, de l'anglès: *platelet-derived growth factor receptor*) està formada per a dos membres, el PDGFR α i el PDGFR β , que tenen diferent afinitat pels lligands PDGF (*platelet-derived growth factor*).

De lligands PDGF n'hi ha quatre: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C i PDGF-D. Les formes biològicament actives d'aquests lligands són formant homodímers (AA, BB, CC, DD) o l'heterodímer AB. La unió dels lligands als receptors induïx la dimerització dels receptors i l'activació dels seus dominis tirosina cinasa. Les combinacions teòriques i observades *in vitro* d'aquests lligands amb els receptors són múltiples, tot i així *in vivo* només hi ha evidències funcionals de les interaccions dels lligands PDGF-AA i PDGF-CC amb l'homodímer de PDGFR α , i dels lligands PDGF-BB amb l'homodímer PDGFR β (Andrae et al., 2008).

Els receptors estan formats per cinc dominis d'immunoglobulines extracel·lulars, i a la regió intracel·lular els receptors tenen un domini tirosina cinasa partit, amb nombrosos residus tirosina que són fosforilats en l'activació dels receptors. Aquests residus fosforilats esdevenen punts d'anclatge per diversos components que generaran diferents senyals. S'hi pot unir GRB2, que activa la via de les ERKs activant la proliferació cel·lular; la subunitat p85 de la PI3K que activa la via de PI3K/AKT promovent supervivència i síntesi proteica; i per últim s'hi pot unir PLC γ (fosfolipasa C γ) que induïx tant la via PI3K com la via DAG/PKC (*diacylglycerol/protein kinase C*) que contribueix a la proliferació cel·lular (Figura I8) (Berridge, 2012).

Les funcions biològiques de la via de PDGF inclouen regulació de la proliferació cel·lular i supervivència, angiogènesi, migració cel·lular, reorganització del citoesquelet i implicació en el desenvolupament embrionari com la gastrulació o la formació de varis òrgans com el pulmó i l'intestí (Andrae et al., 2008).

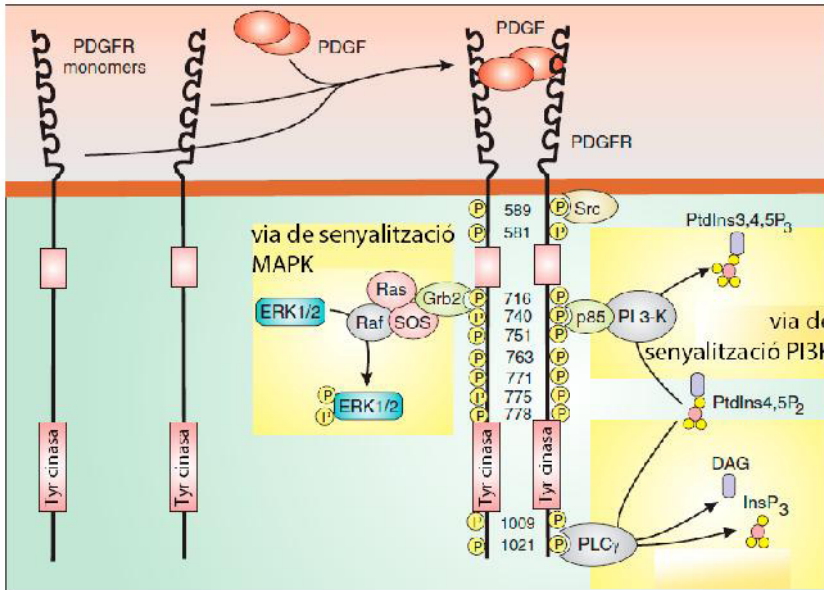


Figura 18. Activació dels PDGFRs. La unió dels lligands en els receptors PDGFRs provoca la seva dimerització i conseqüent activació. Els residus tirosina del domini intracel·lular es fosforilen generant punts d'anclatge a GRB2, que activa la via de les MAPK-ERK; o p85 i PLC γ que activen la via de PI3K/AKT. Figura adaptada de *Berridge et al., 2012*. (Berridge, 2012).

2.2.2 PDGFRs i càncer

Hanahan i Weinberg van descriure el segell identificatiu dels tumors amb diferents habilitats i característiques adquirides, actualitzat recentment: l'autosuficiència en senyals de creixement, la insensibilitat als senyals d'anticroixement, la resistència a la mort cel·lular, la inducció de l'angiogènesi, la capacitat d'induir invasió i metàstasi, el potencial replicatiu il·limitat, la desregulació del sistema energètic cel·lular i la capacitat d'evitar la destrucció immunològica (Hanahan and Weinberg, 2011). Varis estudis han involucrat la senyalització de PDGF/PDGFR en *loops* regulatoris autocrins que aporten autosuficiència de senyals de creixement en cèl·lules tumorals. També existeixen evidències experimentals que impliquen la senyalització de PDGF/PDGFR en l'angiogènesi tumoral, i en la invasió i la metàstasi de cèl·lules tumorals. Així doncs la senyalització de PDGF/PDGFR estaria implicada com a mínim en tres dels processos característics tumorals descrits per Hanahan i Weinberg (Andrae et al., 2008).

L'expressió de PDGF/PDGFRs s'ha observat en cèl·lules tumorals de glioma, i un dels mecanismes proposats d'activació de PDGF en gliomes és via TGF- β . Bruna *et al.* van descriure que la senyalització de TGF β promou la proliferació tumoral a través de la inducció de la transcripció i secreció de PDGF-B en gliomes, quan el gen de PDGF-B no es troba metilat (Bruna et al., 2007).

Per altra banda s'han descrit múltiples alteracions genètiques, com amplificacions, translocacions o mutacions, en els gens de PDGF i PDGFRs en varis tipus de tumors diferents. Així per exemple es troba sobreexpressió de PDGFR α en la majoria dels gliomes; mutacions que activen PDGFR α de manera constitutiva en la majoria de GISTs (tumor de l'estroma gastrointestinal); i múltiples translocacions del gen de PDGFR β en leucèmies mieloides (Andrae et al., 2008).

La senyalització autocrina de PDGF ha estat vinculada a glioblastomes i sarcomes, on actua de manera paracrina promou l'estroma tumoral, tant els fibroblasts tumorals com l'estroma vascular. S'ha observat doncs com l'expressió de PDGF-B promou el reclutament dels perícits en l'angiogènesi tumoral. S'ha descrit que el PDGF-B secretat per les cèl·lules endotelials promou la proliferació i la difusió del perícits i les vSMCs (de l'anglès *vascular smooth muscle cells*) en el procés de l'angiogènesi i l'arteriogènesi. De fet molts dels defectes detectats en ratolins *knockout* per PDGF-B i PDGFR β són defectes vasculars (Andrae et al., 2008; Carmeliet and Jain, 2011). En aquest context cal dir que en condicions fisiològiques el receptor PDGFR β s'expressa en les vSMC i en perícits, i el seu lligand, PDGF-B, s'expressa principalment en cèl·lules endotelials, megacariocits i neurones (Andrae et al., 2008). Desordres en la senyalització de PDGF/PDGFRs s'han observat en diferents malalties vasculars així com en l'angiogènesi tumoral.

2.2.3. Teràpies dirigides a PDGFRs

El mètode més eficaç per bloquejar la senyalització via PDGFR és la inhibició de l'activitat cinasa dels receptors amb TKIs. Els inhibidors desenvolupats fins ara no són completament específics pels PDGFRs i també bloquegen c-KIT i Flt3 (de l'anglès, *FMS-like tyrosine kinase 3*), dos RTKs amb una estructura molt semblant.

Imatinib és un TKI que bloqueja PDGFR α i $-\beta$, la proteïna de fusió bcr-abl, i el receptor c-KIT i Flt3. Aquest fàrmac està aprovat per la FDA per al tractament de la leucèmia mieloide crònica positiva per al cromosoma Filadelfia i per als GIST que contenen una mutació activadora en c-KIT o PDGFR α (FDA, [updated 1/2013-cited 4/2013]; Ksienski, 2010).

Sorafenib és un altre inhibidor multidiana, que inhibeix els PDGFRs, els tres receptors de la família del receptors de factors de creixement d'endoteli vascular (VEGFR, de l'anglès: *vascular endothelial growth factor receptor*), VEGFR-1,-2 i -3, i la serina treonina cinasa RAF-1 (Wilhelm et al., 2006). Va ser el primer inhibidor multidiana aprovat per la FDA, l'any 2005, i es va aprovar per al tractament de pacients amb carcinoma de cèl·lula renal (RCC). Dos anys més tard es va aprovar el seu ús per al tractament de pacients amb tumor hepatocel·lular (HCC) no extirpable (NCI, [updated 11/2010-cited 4/2013]).

Sunitinib és un inhibidor multidiana amb un espectre semblant a sorafenib. Els principals RTKs inhibits per sunitinib són PDGFR α i PDGFR β , VEGFR-1,-2 i -3, c-KIT, CSF1 (receptor de tipus I de factor estimulador de colònies), Flt3 i RET (Mendel et al., 2003). Sunitinib inicialment es va aprovar per la FDA per al tractament pacients de RCC avançat i per pacients de GIST resistents a imatinib. Actualment també s'utilitza en el tractament de pacients amb tumors neuroendocrins en pàncrees no extirpables o metastàtics (NCI, [updated 5/2011-cited 4/2013]), i la seva eficàcia antitumoral i antiangiogènica s'ha observat preclínicament en molts altres models tumorals com colon, pulmó o melanoma (Faivre et al., 2007).

Mentre imatinib i sunitinib són dos TKIs de primera generació, **pazopanib** és un TKI de segona generació amb una elevada especificitat per VEGFR-1, -2 i -3, PDGFR α i PDGFR β , i c-KIT. Diversos estudis preclínic *in vivo* han demostrat com pazopanib inhibeix el creixement tumoral de models xenògrafs de tumors de colon, melanoma, pròstata, tumors renals, de mama i de pulmó (Kumar et al., 2007). Pazopanib ha demostrat activitat antitumoral en clínica, i va ser aprovat per la FDA per al tractament de pacients amb RCC avançat, i més recentment per al tractament de pacients amb sarcoma de teixit tou avançat, que han rebut prèviament quimioteràpia (FDA, [updated 4/2012-cited 4/2013]). També s'està avaluant l'activitat antitumoral de pazopanib en diversos estudis clínics com en càncer de mama, on resultats preliminars de diferents estudis en fase II mostrarien activitat de pazopanib administrat individualment o bé en

combinació amb lapatinib en tumors ErbB2+ (Schutz et al., 2010). Pazopanib també ha mostrat una activitat significativa en tumors de tiroides (Schutz et al., 2010), en NSCLC, on s'està avaluant el seu ús com a agent individual o en combinació amb quimioteràpia (Ulahannan and Brahmer, 2011). També s'estan realitzant estudis de fase I i II en tumors d'ovari resistents a cisplatí o recaigudes sensibles administrant pazopanib en combinació amb Doxil (*liposomal doxorubicin*) (Clinicaltrials.gov, 2013 -e).

Un altre TKI que inhibeix els tres receptors de VEGF, els PDGFR i c-KIT, és **axitinib**. Aquest ha estat aprovat recentment per la FDA per al tractament del RCC avançat en cas de fallar les altres teràpies estàndards (FDA, [updated 1/2012-cited 4/2013]). En un estudi de fase I va mostrar activitat en diversos tumors (Rugo et al., 2005), i s'estan realitzant estudis més avançats en NSCLC amb axitinib com a agent individual o en combinació amb diferents agents quimioterapèutics (Ulahannan and Brahmer, 2011).

	Nom	Dianes	Indicació de la FDA i any d'aprovació
TKIs	Imatinib (Gleevec®)	PDGFR α/β Bcr-abl c-KIT Flt3	Leucèmia mieloide crònica (2001) GIST amb c-KIT o PDGFR α mutats (2002)
	Sorafenib (Nexavar®)	PDGFR α/β VEGFR-1,-2,-3 RAF-1	RCC avançat (2005) HCC no extirpable (2007)
	Sunitinib (Sutent®)	PDGFR α/β VEGFR-1,-2,-3 c-KIT i RET	RCC avançat (2006) GIST resistents a imatinib (2006) Tumors neuroendocrins de pàncrees metastàtics o no extirpables (2011)
	Pazopanib (Votrient®)	PDGFR α/β VEGFR-1,-2,-3 C-KIT	RCC avançat (2009) Sarcomes de teixit tou avançat (2012)
	Axitinib (Inlyta®)	PDGFR α/β VEGFR-1,-2,-3 c-KIT	RCC avançat (2012)

Taula I3. Inhibidors dels receptors ErbBs aprovats per ús clínic per la FDA.

2.2.3.1 L'activitat antiangiogènica dels inhibidors

Els últims inhibidors descrits, a part de mostrar activitat antitumoral també presenten activitat antiangiogènica, ja que bloquegen els receptors VEGFRs; receptors implicats en el procés angiogènic, estimulants la migració i proliferació de les cèl·lules endotelials. A

més a més bloquejen els dos receptors de PDGF, PDGFR α i PDGFR β , que s'expressen en la cèl·lula tumoral però també en les cèl·lules murals, tenint també un paper clau en l'angiogènesi (Folkman, 2007). Així doncs la inhibició d'aquests receptors pot donar l'efecte dual antitumoral i antiangiogènic.

L'activitat antiangiogènica de sunitinib s'ha demostrat tant *in vitro* com *in vivo*, on la seva administració ha fet disminuir la microdensitat vascular, ha previngut la neovascularització en un model de tumor vascular i ha reduït la formació de metàstasis pulmonars en un model de carcinoma de Lewis (Mendel et al., 2003; Osusky et al., 2004). Així com també ha estat demostrada una activitat antiangiogènica per part de pazopanib, on s'ha observat que aquest inhibidor bloqueja la proliferació de les cèl·lules endotelials HUVEC induïda per VEGF; i també s'ha observat com pazopanib bloqueja l'angiogènesi induïda per VEGF o bFGF (*basic fibroblast growth factor*, o FGF2) en un model de còrnia de ratolí o en models de matrigel implantat en ratolí (Kumar et al., 2007).

2.3 Vies de senyalització dels RTKs

Fins ara hem comentat dues famílies de receptors tirosina cinasa (RTKs), ambdues involucrades en la progressió tumoral. Tant els receptors ErbBs com els PDGFRs, s'activen per la unió de lligand i els residus fosforilats de tirosina esdevenen ports d'anclatge a proteïnes que iniciaran diverses cascades de senyalització. A continuació volem comentar les principals vies de senyalització efectores d'aquestes dues famílies de RTKs; la via de PI3K/AKT, la cascada de les ERKs i la via d'activació STAT3.

2.3.1 PI3K/AKT

Les PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) són una família de cinases que fosforilen el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) per generar el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3), reacció que pot ser revertida per la PIP3 fosfatassa PTEN (Figura I9). Les PI3K de la classe IA són les que s'activen pels RTKs. Són heterodímers formats per una subunitat reguladora (p85) i una subunitat catalítica (p110); on la subunitat reguladora és la que interacciona amb els residus fosforilats de les regions intracel·lulars dels RTKs. Aquesta interacció atura la inhibició que p85 fa sobre p110 obtenint una activitat completa de la

PI3K. La cinasa activa és reclutada a la membrana per fosforilar PIP2 (Engelman et al., 2006). AKT (o PKB) és una serina/treonina cinasa amb un domini que interacciona amb PIP3 en la membrana plasmàtica. Aquesta unió produeix un canvi conformacional que permetrà que PDK1, també a la membrana plasmàtica, fosforili el residu Thr308 conferint una activitat parcial a AKT. És la fosforilació d'un segon residu, el de la Ser473, la que aporta l'activació completa a AKT. Aquesta fosforilació és realitzada per mTORC2 (el complexe 2 d'mTOR, de l'anglès *mammalian target of rapamycin*) però els mecanismes que regulen aquesta activitat del complexe encara són desconeguts. (Pearce et al., 2011).

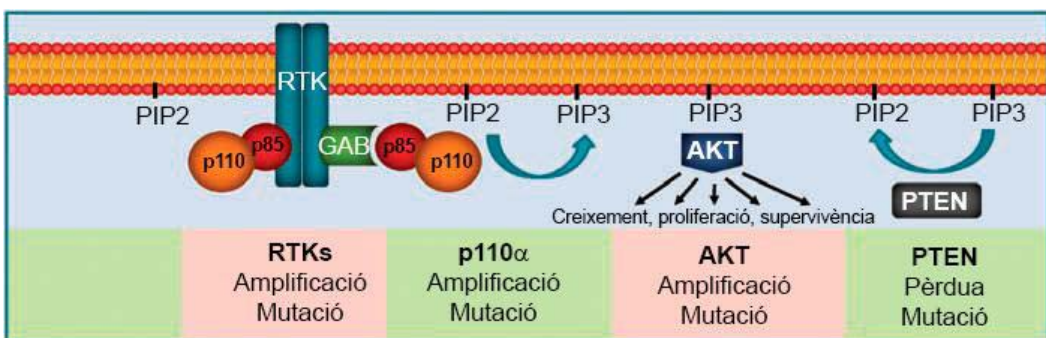


Figura I9. Mutacions i alteracions associades a càncer que alteren la via de PI3K/AKT.
Figura adaptada de Yuan TL i Cantley LC, *Oncogene*, 2008. (Yuan and Cantley, 2008)

S'han identificat fins a 130 substrats d'AKT i quan s'activa inicia cascades de transducció de senyals que aporten canvis funcionals en la cèl·lula; i és que s'ha descrit AKT en un paper central en la regulació del metabolisme, o en el creixement i la supervivència cel·lular (Figura I10) (Manning and Cantley, 2007; Pearce et al., 2011).

AKT promou la supervivència cel·lular bloquejant directament proteïnes proapoptòtiques com BAD, la procaspasa 9 i els factors de transcripció que activen gens entre d'altres involucrats en apoptosi, com FOXO o p53 a través de l'activació del seu regulador negatiu MDM2. AKT també té un efecte en la supervivència cel·lular mitjançant l'activació de vies d'absorció de nutrients i metabolisme. Per exemple, AKT estimula el transport de glucosa en resposta a la insulina, i permet la translocació a la membrana del transportador de glucosa Glut4; FOXO1 també pot contribuir a l'homeostàsia de la glucosa, o pot regular el metabolisme de lípids regulant GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), que alhora està involucrada en apoptosi o proliferació (Manning and Cantley, 2007).

L'activació del complex mTOR1, a través de la fosforilació de TSC2 i PRAS40 mitjançant AKT, contribuirà a diversos processos involucrats en metabolisme, creixement, proliferació o angiogènesi. Per altra banda l'activació d'AKT estimula la proliferació cel·lular promovent l'exclusió nuclear de p27 o p21 dos inhibidors de cinases dependents de ciclines reguladores del cycle cel·lular, evitant l'aturada del cycle cel·lular; o activant GSK3 que controla també a ciclines de la fase G1 (Manning and Cantley, 2007).

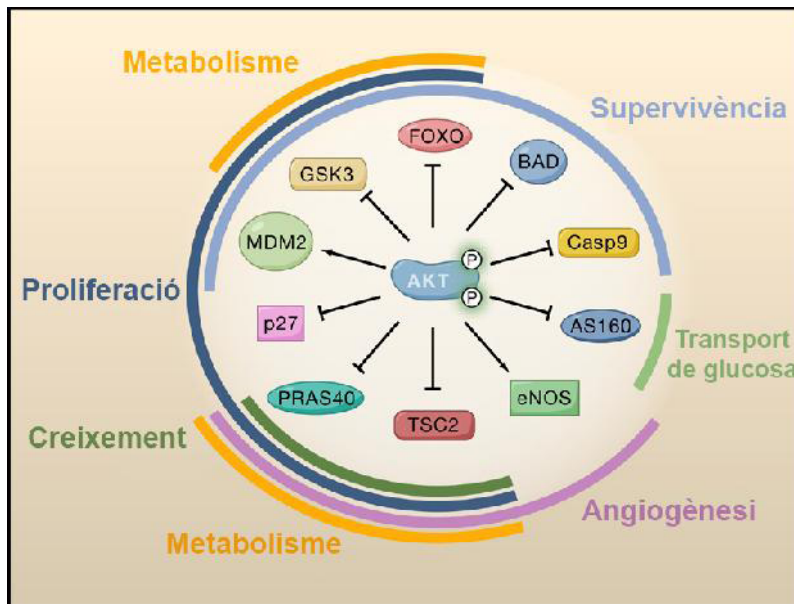


Figura 110. Funcions cel·lulars desencadenades per l'activació d'AKT. La fosforilació d'AKT regula l'activació (fletxes) o la inhibició (fletxes tallades) de diversos substrats, i contribueix a la regulació de processos cel·lulars com la supervivència, proliferació, el transport de glucosa, l'angiogènesi, metabolisme o creixement. Figura adaptada de *Manning BD i Cantley LC, Cell, 2007* (Manning and Cantley, 2007).

Així doncs una sobreactivació de la via PI3K/AKT pot desembocar en alteracions en aquests processos cel·lulars afavorint la tumorigènesi. Les alteracions descrites que poden provocar aquest efecte són mutacions activadores o amplificacions de PI3KCA, el gen que codifica per p110 α (una subunitat de p110), la pèrdua de PTEN, mutacions en AKT o l'amplificació o sobreactivació de RTKs (Figura 19) (Yuan and Cantley, 2008). Es troben mutacions activadores en AKT o en la subunitat p110 α de PI3K en el 5% o el 25% dels tumors de mama respectivament. També s'ha vist per exemple que nivells baixos de PTEN contribuïen a la resistència a trastuzumab en tumors de mama ErbB2+ (Nagata et al., 2004). Diversos inhibidors de la via PI3K/AKT estan en desenvolupament, ja sigui inhibint només PI3K, mTORC o AKT, o inhibidors duals de PI3K i mTORC; i

alguns ja han estat aprovats per la FDA. Com és el cas d'everolimus, un inhibidor d'mTOR, que va ser aprovat el 2009 per el tractament en RCC quan ha fallat sunitinib o sorafenib, i posteriorment es va aprovar per a tumors de mama ErbB2 negatius o tumors neuroendocrins amb origen pancreàtic, entre d'altres (FDA, [updated 7/2012-cited 4/2013]).

Com ja hem comentat, les dues famílies de RTKs comentades en aquest estudi, ErbBs i PDGFRs, activen la via de PI3K/AKT. Els receptors ErbBs s'uneixen directament a p85, com ErbB3 que conté sis punts d'unió, o a través d'una proteïna adaptadora GAB1, com és el cas d'ErbB1 (Figura I6) (Hynes and Lane, 2005). Els PDGFRs poden activar la via de les PI3K unint-se a la subunitat reguladora p85, o activant la PLC (Berridge, 2012), que hidrolitza a PIP2 generant DAG (diacilglicerol) i PIP3 (Katan, 1998).

En conseqüència a la inhibició d'ErbB1 amb gefitinib es bloquegen les vies d'ERK1/2 i AKT (Janmaat et al., 2003), provocant entre d'altres una parada en el cicle cel·lular en G1 i S; l'activitat d'AKT s'ha determinat com a indicador molecular de resposta a inhibidors d'ErbB1 (Takeuchi and Ito, 2010).

2.3.3 Cascada de les MAPK ERK

Les vies de les proteïnes cinases activades per mitògen (MAPK) controlen diversos processos fonamentals per la cèl·lula, com són el metabolisme, supervivència, mitosis o apoptosi. En els mamífers existeixen tres grups de MAPK; les JNK, les p38 o les ERKs. Les MAPK són les últimes d'una cascada de tres cinases activades seqüencialment per fosforilació. Així doncs les MAPK3 fosforilen les MAPK2, i aquestes activen per fosforilació a les MAPK.

Les JNK s'activen sobretot per estrés cel·lular i activen, entre d'altres, els factors de transcripció Jun, p53 o SMAD4, i inactiven STAT3. Les JNKs s'han descrit involucrades en molts processos cel·lulars, entre d'altres processos tant importants com l'apoptosi, la resistència a la insulina en la diabetis tipus II, l'autofàgia o la resposta inflamatòria (Bogoyevitch et al., 2010). Les p38 s'activen també per estrés i per citocines inflamatòries, compartint molts dels estímuls amb les JNKs. Els seus substrats són alguns factors de transcripció com NF- κ B o p53, entre molts d'altres; i la seva activitat és crítica en la resposta immune i inflamatòria (McKay and Morrison, 2007).

Les ERK1 i ERK2 s'activen sobretot per factors de creixement, a través de la cascada de les MAPK RAS-RAF-MEK-ERK. La família de les GTPases RAS està composta per tres membres: KRAS, HRAS i NRAS. Aquestes GTPases es troben ancorades a la membrana citoplasmàtica i s'activen amb l'estimulació dels RTKs. La fosforilació dels residus de tirosina dels receptors crea punts d'anclatge per a la proteïna adaptadora GRB2, que recluta al factor d'intercanvi de nucleòtids SOS. Aquest intercanvia la guanosina difosfat (GDP) unida a RAS per una guanosina trifosfat (GTP) i activa la GTPasa, que podrà interactuar amb diversos substrats. Uns d'ells són les serina/treonina cinases RAF. La interacció de RAS amb RAF fosforila i activa a RAF. RAF, que actua de MAPK cinasa cinasa (MAPKKK), fosforila a MEK1/2 en dos residus de serina, i en conseqüència aquestes fosforilen a ERK1/2 en un residu de treonina i un de tirosina. Les cinases ERK un cop actives fosforilen la proteïna RSK, i ambdues es transloquen al nucli on activen a diversos factors de transcripció com c-Myc, c-Fos o STAT3 modificant processos cel·lulars com la síntesi de proteïnes, proliferació o supervivència. (Figura I11) (Santarpia et al., 2012).

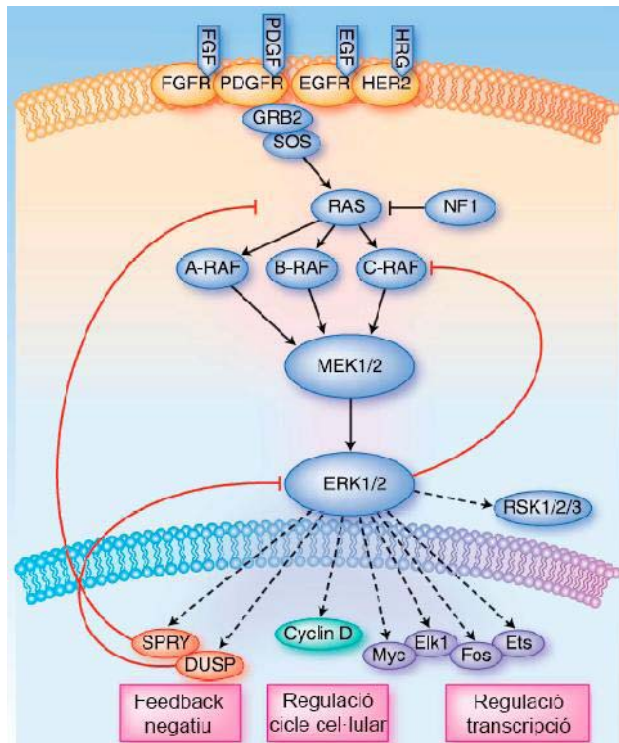


Figura I11. Via de senyalització RAS-RAF-MEK-ERK. Figura adaptada de *Pratilas CA and Solit DB, Clin.Can.Res. 2010* (Pratilas and Solit, 2010).

Aquesta cascada de transducció de senyals es troba activada en molts tumors mitjançant diversos mecanismes, com poden ser alteracions en l'activació del RTK, pèrdua del supressor tumoral NF1 (neurofibrominina 1) que bloqueja RAS, o per mutacions en RAS, BRAF o MEK1/2. Els nivells d'ERK regulen també un *feedback loop* negatiu, i una alteració en els membres d'aquesta via reguladora també podria afectar l'activació de la via (Figura I11) (Pratilas and Solit, 2010).

La translocació d'ERK1/2 al nucli és essencial per la progressió de la fase G1 a S. La seva senyalització també promou la supervivència cel·lular per dues vies, inactivant components proapoptòtics i incrementant la transcripció de gens de supervivència. ERK1/2 per exemple fosforila els factors de transcripció FOXO promovent la seva degradació via proteasoma. Aquests factors de transcripció quan estan actius promouen la transcripció de gens proapoptòtics, i així ERK1/2 inhibeix diverses funcions supressores tumorals. Per altra banda ERK1/2 també pot fosforilar Bim i Bad, dues proteïnes proapoptòtiques, induint així per diversos mecanismes l'apoptosi. Per altra banda l'activació d'ERK també s'ha associat a mort cel·lular. Un dels mecanismes proposats és que sembla que l'activació d'ERK1/2 disminueix l'activació d'AKT, i per tant promou la mort cel·lular per disminució de la senyal de supervivència. Tot i així en aquest camp els mecanismes encara són bastant desconeguts però sembla molt que depenen del tipus cel·lular, de l'estímul rebut i de la intensitat del senyal (Mebratu and Tesfagzi, 2009).

Les mutacions puntuals en la família de gens RAS són molt freqüents i es troben en el 30% dels tumors humans; així com també es troba freqüentment mutat B-RAF, sobretot en melanomes i tumors de tiroides i colon. Així doncs és una via diana per a les teràpies antitumorals, i existeixen diversos inhibidors dirigits a RAF o MEK. Sorafenib, un dels inhibidors comentats anteriorment, va ser el primer inhibidor de RAF en entrar a la clínica; i va ser desenvolupat inicialment com a inhibidor d'aquest efector, encara que més endavant es va veure que també inhibia receptors com VEGFRs i PDGFRs. Tot i així l'activitat limitada de sorafenib en pacients amb B-RAF mutat va accelerar l'aparició de més inhibidors de RAF de segona generació, més selectius i més potents, i que estan donant bons resultats sobretot en assajos clínics de melanoma (Santarpia et al., 2012).

L'activació d'ErbB1 estimula la via de RAS-RAF-MEK-ERK, i a més a més s'ha observat que ERK pot induir sobreexpressió dels lligands d'ErbB1 promovent un *loop* autocrí que

afavoreix el creixement del tumor (McCubrey et al., 2007). Per altra banda ErbB1 activa la fosfatasa MKP1, que activa preferencialment sobre les altres dues MAPK, p38 i JNK inhibint-les (Takeuchi and Ito, 2010). Els altres ErbBs i els PDGFRs un cop actius també tenen punts d'anclatge a GRB2, i activen la via de RAS-RAF-MEK-ERK (Berridge, 2012).

2.3.4 Via de senyalització STAT

La família de les proteïnes STAT (transductores de senyals i activadores de transcripció) esta formada per set membres: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b i 6. Són proteïnes que dimeritzen i quan estan actives es transloquen al nucli i s'uneixen a elements específics del DNA. També poden formar tetràmers augmentant la seva estabilitat en la unió al DNA i incrementant també l'activitat transcripcional. Contenen un domini SH2 (domini src homòleg) amb el que poden interaccionar els dos monòmers STAT i que també permet la interacció amb receptors fosforilats, o amb les cinases JAK i SFK (*Src family kinases*), que fosforilaren i activen STAT (Levy and Darnell, 2002).

Les JAK s'uneixen constitutivament als receptors d'interleucines i citocines, que les activen en resposta a lligands externs: Les JAK fosforilen els receptors creant punts d'anclatge per les STAT, que un cop unides també fosforilaran i activaran (Lai and Johnson, 2010). La c-Src també interacciona amb RTKs com ErbB1 i VEGFR, i en conseqüència activa a STAT3. Però aquest també es pot activar de manera independent a JAK i a c-Src fosforilant-se directament per les cinases dels RTKs, com ErbB1, PDGFRs i CSF-1R (*colony stimulating factor-1R*) (Silva, 2004; Vignais et al., 1996). Així doncs s'ha observat que l'activació d'ErbB1 condueix a l'activació de STAT3 de manera dependent o independent de JAK, i l'expressió del receptor fosforilat correlaciona amb la fosforil·lació de STAT3 en pacients de NSCLC (Kluge et al., 2009; Lai and Johnson, 2010; Song et al., 2003).

En l'última dècada STAT3 ha rebut una atenció especial degut a la seva intervenció en diverses vies de senyalització oncogènica. STAT3 té un paper clau en el desenvolupament embrionari, i en el creixement i supervivència cel·lular. S'ha observat que l'absència de STAT3 afecta a la regeneració hepàtica i a l'homeòstasi de la glucosa. L'activació constitutiva d'STAT3 s'ha vist implicada en oncogènesi hepàtica, sobrerregulant gens de proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 o la survivina, i bloquejant l'expressió de p53. En

el 50% de les línies cel·lulars humanes de carcinoma hepatocel·lular (HCC) es troben nivells alts de STAT3 actiu (Subramaniam et al., 2012).

3 TERÀPIA ANTIANGIÒGÈNICA

3.1 L'angiogènesi tumoral

L'angiogènesi es la generació de vasos sanguinis a partir d'altres preexistents, i existeix tant a nivell fisiològic com també patològic. L'angiogènesi fisiològica és fonamental en el desenvolupament embrionari, però en l'individu adult els vasos sanguinis es troben quiescents i l'angiogènesi només té lloc en el cicle reproductiu femení, en la placenta durant l'embaràs i en la cicatrització de ferides. Un desequilibri dels factors que regulen aquest procés donarà lloc a malalties com desordres inflamatoris, oculars i neurodegeneratius, i és que l'angiogènesi s'ha trobat implicada en més de 70 malalties (Carmeliet, 2005). Entre totes aquestes patologies també hi trobem el càncer, en el que s'ha demostrat que l'angiogènesi és un pas crucial en la tumorigènesi, no com a procés iniciador de la malaltia, sinó com a promotor de la progressió i la metàstasi (Folkman, 2007; Hammers et al., 2010). De fet l'angiogènesi és un camp d'investigació àmpliament explorat des que Judah Folkman en va proposar el vincle amb la progressió tumoral l'any 1971 (Folkman, 1971).

El procés angiogènic està regulat per la presència de factors estimuladors i inhibidors angiogènics, i l'equilibri entre aquests manté l'homeòstasi i la quiescència de la vasculatura. Un desequilibri d'aquests factors, com un augment dels estimuladors, farà que s'activi el procés angiogènic, efecte que s'anomena el *switch* o canvi angiogènic (Hanahan and Folkman, 1996). Les cèl·lules tumorals secreten diversos factors proangiogènics com PDGF-B, bFGF o VEGF, que induiran la formació de nous vasos (Figura I12) (Folkman, 2007).

VEGF, o VEGF-A, és el principal efector proangiogènic de sis membres que componen la seva família. Aquests factors s'uneixen als receptors VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) i VEGFR-3 (Flt-4), on és el segon receptor al que s'uneix principalment VEGF-A.

També s'ha vist que s'uneix a VEGFR-1, però la seva implicació en els processos angiogènics no està clara. La unió del lligand al receptor indueix la dimerització d'aquest i l'activació de les vies de senyalització que intervenen en l'angiogènesi, entre elles les MAPK i PI3K/AKT. El VEGF secretat per les cèl·lules tumorals s'uneix a VEGFR-2 o les neuropilines, ambdós receptors expressats en les cèl·lules endotelials, estimulando la permeabilitat vascular i la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials. En canvi el VEGF secretat autocrinament, per les mateixes cèl·lules endotelials, manté l'homeostàsis vascular (Carmeliet and Jain, 2011; Kowanetz and Ferrara, 2006).

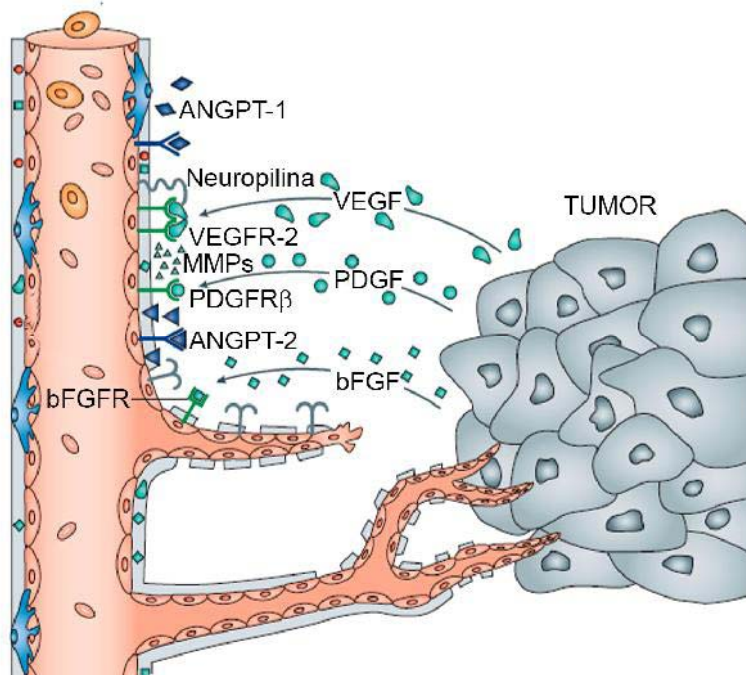


Figura I12. El tumor secreta factors angiogènics que estimulen l'angiogènesi. El tumor secreta factors, com VEGF, PDGF-B, bFGF o ANGPT-2, que estimulen el procés angiogènec. Adaptada de *Folkman, J. (2007) Nat. Rev. Drug Discov.*(Folkman, 2007)

Un altre factor angiogènec alliberat per les cèl·lules tumorals és l'angiopoietina-2 (ANGPT-2) (Figura. I12). Aquesta competeix amb l'angiopoietina-1 (ANGPT-1) pel receptor Tie-2 expressat en la cèl·lula endotelial. Mentre que l'ANGPT-1 ajuda a estabilitzar la vasculatura i a mantenir l'estat quiescent dels vasos sanguinis; l'ANGPT-2 augmenta la migració de les cèl·lules endotelials afavorint el brot dels vasos per formar-ne de nous, promou el desencanxament dels perícits que recobreixen aquests vasos i la

degradació de la membrana basal vascular. Aquest darrer procés també es veu afavorit per la presència de les metal·loproteïnases (MMPs), que poden ser alliberades per les cèl·lules tumorals i per les cèl·lules endotelials estimulades per VEGF. També participen en la degradació de la matriu extracel·lular, procés necessari per permetre la migració de les cèl·lules endotelials (Carmeliet and Jain, 2011; Folkman, 2007).

Tal i com hem comentat en apartats anteriors, PDGF-B també és un factor important en l'angiogènesi, i pot ser alliberat també per les cèl·lules tumorals. La seva presència, així com la de l'ANGPT-1 o TGF- β , estimula el reclutament de les cèl·lules murals (perícits i vSMC) que recobriran les cèl·lules endotelials; procés necessari per aconseguir la maduresa, estabilitat i funcionalitat dels vasos (Carmeliet and Jain, 2011). PDGFR β s'expressa en les cèl·lules murals, de manera que quan es sobreexpressen els seus lligands els vasos estan més coberts per aquestes cèl·lules i s'observa una acceleració del creixement del tumor. Per altra banda però quan s'inhibeix el PDGFR β el reclutament de perícits disminueix i s'observa un increment en l'apoptosi de les cèl·lules endotelials (Carmeliet, 2005).

bFGF va ser un dels primers factors angiogènics descoberts, i altres membres de la mateixa família també estan involucrats en aquest procés. Els FGFs estimulen els receptors FGFRs de les cèl·lules endotelials, o bé indueixen l'alliberament d'altres factors angiogènics per altres tipus cel·lulars. Nivells baixos d'aquests factors són necessaris per al manteniment de la integritat vascular, i la completa inhibició dels receptors provoca la desintegració dels vasos (Carmeliet and Jain, 2011).

3.2 Teràpies amb inhibidors angiogènics, dirigides a VEGFRs

Bevacizumab (Avastin[®]) és un anticòs monoclonal que s'uneix a VEGF i bloqueja la unió amb els receptors, i s'ha observat que la teràpia amb bevacizumab pot prevenir la formació de nous vasos millorant l'estabilització de la malaltia i frenant la progressió tumoral (Kabbinar et al., 2005). Bevacizumab va ser el primer inhibidor de l'angiogènesi aprovat per la FDA per al tractament de pacients amb tumor colorectal l'any 2004, i actualment també està aprovat en combinació amb quimioterapèutics per al tractament dels tumors colorectals metastàtics progressius (2013). Actualment ja està aprovat també per al tractament de pacients de NSCLC no extirpable, avançat o metastàtic, en combinació amb CDDP o placlitaxel (2006); com a segona línia de

tractament en glioblastomes (2009) i en RCC metastàtic en combinació amb interferó- α (2009) (NCI, [updated 1/2013-cited 4/2013]).

Més endavant se'n van anar desenvolupant més que també s'han aprovat per al tractament en pacients, com els TKIs ja comentats en l'apartat 2.2.3: sorafenib, sunitinib, pazopanib o axitinib. Quatre TKIs que entre d'altres receptors, inhibeixen els tres receptors de la família dels VEGFRs i els PDGFRs, també implicats en angiogènesi. En d'altres inhibidors es va observar l'activitat antiangiogènica després d'haver-se aprovat, és el cas per exemple de bortezomib, aprovat l'any 2003 com a inhibidor del proteasoma per el tractament del mieloma múltiple, que més endavant es va demostrar que exercia també activitat antiangiogènica (Folkman, 2007).

L'eficàcia de les teràpies antiangiogèniques està basada en que el creixement tumoral és angiogènic-dependent; en que els tumors detectables són aquells que han passat de l'estadi microscòpic gràcies l'estimulació angiogènica; i en que la cèl·lula endotelial, diana principal de la teràpia antiangiogènica, és genèticament estable en comparació amb la cèl·lula tumoral (Folkman, 2006). Tot i així s'està observant que en alguns tumors les teràpies que bloquegen VEGF, com bevacizumab o sunitinib, sí que aporten una millora en la supervivència lliure de progressió, però no en allargar la supervivència general, apareixent malignitzacions dels tumors.

S'han proposat diversos mecanismes per explicar aquesta resistència a les teràpies antiangiogèniques que impliquen canvis en les cèl·lules tumorals, endotelials o estromals (Bergers and Hanahan, 2008; Carmeliet and Jain, 2011). A més a més alguns estudis demostren que el bloqueig de VEGF incrementa la hipòxia i indueix un estat inflamatori pro-tumorigènic, i promou la invasió i la metastasi malgrat la inhibició del creixement del tumor primari i l'increment en supervivència (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009).

3.3 PDGFRs i teràpies antiangiogèniques en tumors germinals testiculars

S'ha descrit implicació dels PDGFRs en el desenvolupament embrionari testicular (Basciani et al., 2010). Així per exemple, ratolins *pdgfa*^{-/-} postnatsals presenten tamanys de testicles reduïts, reducció de la població de cèl·lules de Leydig i de testosterona circulant (Andrae et al., 2008). S'ha involucrat també a PDGFR β en la regulació de la

proliferació i migració dels gonòcits, els progenitors de les cèl·lules mare espermatogònies, en el desenvolupament embrionari (Basciani et al., 2008).

L'àmplia implicació de la senyalització aberrant de PDGF/PDGFR en diferents neoplàsies i malalties i el rol en el desenvolupament embrionari testicular, fa que la via de PDGF/PDGFR sigui una via a estudiar en la tumorigènesi dels tumors testiculars. Així doncs en una sèrie de 51 pacients amb TGTs es van detectar nivells de PDGF en sèrum significativament augmentats comparats amb sèrum no tumoral (Bentas et al., 2003).

Com en altres neoplàsies, en els TGTs s'ha suggerit un rol de l'angiogènesi en el desenvolupament i la progressió tumoral. Viglietto *et al.* van observar com en les neoplàsies testiculars, comparades amb els testicles normals, es detectaven nivells més elevats d'expressió de VEGF i VEGFR i s'observava també un augment en la microdensitat vascular (Viglietto et al., 1996).

c-KIT també està implicat en el desenvolupament testicular, és un regulador clau de l'espermatogènesi, i el seu lligand SCF (de l'anglès *stem cell factor*) és produït per les cèl·lules de Sertoli en els testicles (Manova et al., 1990; Rossi et al., 1991). A més a més es un receptor que es troba expressat en el 80-100% dels TGT seminomes, encara que en molt més baixa freqüència en els no seminomatosos (Madani et al., 2003).

Així doncs els inhibidors de PDGFRs descrits anteriorment, i sobretot els que també bloquegen els VEGFRs i també c-KIT, podrien ser uns bons candidats a testar com a alternativa de tractament en els TGTs.

MATERIALS I MÈTODES

1 ANIMALS I ESTABULACIÓ

Per realitzar aquests estudis es van utilitzar ratolins mascles atímics nu/nu swiss de 5-6 setmanes d'edat i 20-22 g de pes (Harlan, Espanya). Els ratolins es van mantenir en condicions de temperatura constant, de 20-25°C, i en condicions SPF (lliure de patògens específics) i esterilitat. La beguda i el menjar es va proporcionar ad libitum. Tots els experiments es van realitzar en cabines de flux laminar vertical, i els procediments als que van ser sotmesos van ser aprovats pel comitè ètic especialista en experimentació animal de l'IDIBELL i de la Generalitat de Catalunya.

1.1 Implantació ortotòpica de tumors germinals testiculars en ratolins atímics

En aquest estudi s'ha treballat *in vivo* amb dos models ortotòpics de tumors testiculars de cèl·lules germinals (TGTs) d'origen humà, el TGT38 i el TGT44. Ambdós tumors han estat establerts en el Laobratòri de Recerca Translacional (LRT) de l'Institut Català d'Oncologia (ICO) pel Dr. Alberto Villanueva. El seu creixement es va perpetuar en ratolins atímics, utilitzant la tècnica d'implantació ortotòpica en l'òrgan d'origen del tumor humà, en aquest cas els testicles.

El tumor a implantar s'extreia del ratolí donador just en el moment del sacrifici, i es rentava amb medi de cultiu DMEM amb 10% FBS, 50 unitats/ml de penicil·lina i 50 µg/ml d'estreptomicina, per garantir que el tumor estigués lliure de contaminacions. Un cop extret es realitzaven fragments uniformes de 4x4 mm aproximadament, que es mantenien en el medi de cultiu esmentat fins al moment d'implantació.

Els ratolins s'anestesiaven amb inhalació d'isofluorà, es desinfectava la pell de l'abdomen amb povidona iodada (Betadine) i es realitzava una incisió de la pell i la paret de l'abdomen. A continuació s'exterioritzaven els testicles col·locant-los sobre una gasa

estèril. Un fragment del tumor humà a implantar es suturava a cada testicle, realitzant tres punts amb un fil de sutura Prolene 7.0. El fragment de tumor es col·locava en una zona propera a vasos sanguinis, sense obstruir-los, i es subjectava amb tres punts de sutura. Abans de tancar la laparotomia es posaven 5 gotes de sèrum fisiològic a la cavitat abdominal per facilitar la rehidratació de l'animal en el postoperatori. Un cop acabada la intervenció es tancava la incisió, paret muscular i pell, amb grapes de 9 mm (Becton-Dickinson) i es desinfectava altre cop la zona operada amb povidona iodada. L'animal es deixava reposar sobre una gasa estèril i es col·locava una làmpara a una distància propera de la gàbia per donar escalfor durant els 10 minuts fins que l'animal es despertava. L'analgèsic meloxicam 5 mg/kg s'administrava subcutàniament un cop finalitzada la intervenció i els dos dies següents a l'operació. Les grapes s'extreien fàcilment 8-10 dies després, un cop s'observava cicatrització de la ferida.

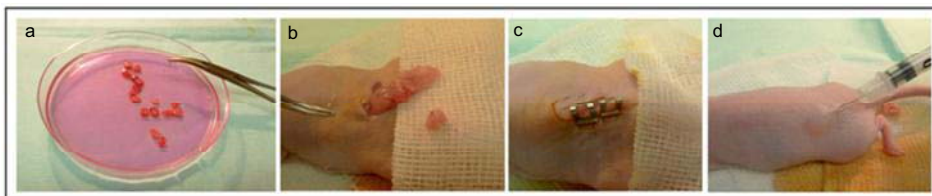


Figura M1. Imatges de l'operació d'implantació del tumor TGT38 ortotòpicament en un ratolí atímic. a) fragments uniformes del TGT38 en medi DMEM (10% FBS, i P/S). b) Es realitzava una incisió laparotòmica, en ratolins atímics anestesiats, i s'externalitzaven els testicles del ratolí, on es suturava un fragment de tumor utilitzant el fil de sutura Prolene 7.0. c) Un cop estaven implantats els dos fragments es tancava la incisió laparotòmica amb dues o tres grapes de 9 mm. d) Administració subcutània de meloxicam 5 mg/kg el dia de la intervenció i els dos dies consecutius.

1.2 Models de tumors ortotòpics testiculars utilitzats

En aquest estudi es van mantenir i utilitzar dos tumors TGTs *in vivo*, i es van estudiar també mostres de TGTs per proteïna i RNA:

Els tumors estudiats *in vivo*:

TGT38: coriocarcinoma pur procedent d'un pacient no tractat amb CDDP que presentava metàstasis pulmonars. Aquest tumor va ser descrit per Castillo-Avila et al. (Castillo-Avila et al., 2009).

TGT44: era un nou model de tumor testicular ortotòpic no descrit abans. Provenia d'una metàstasi retroperitoneal de tumor testicular de components mixtes, on el pacient

va presentar refractarietat a la primera línia de quimioteràpia basada en CDDP. Un cop implantat es va observar que el component crescut en el tumor ortotòpic era el de sac vitel·lí.

Tumors dels que s'han obtingut mostres per estudiar expressió de proteïnes i mRNA:

TGT38R: variant resistent a CDDP del coriocarcinoma TGT38 que es va obtenir mitjançant l'administració continuada de CDDP (Castillo-Avila et al., 2009).

TGT1: carcinoma de sac vitel·lí que procedia d'un pacient que no va ser tractat amb CDDP i presentava metàstasis pulmonars (Castillo-Avila et al., 2009).

1.3 Tractaments *in vivo*

1.3.1 Esquema de tractament dels experiments amb el TGT38

El TGT38 va ser tractat amb lapatinib, amb pazopanib i amb la combinació d'ambdós fàrmacs. Ambdós fàrmacs, lapatinib (Tyverb[®]) i pazopanib (Votrient[®]) van ser proporcionats per GlaxoSmithKline. Tots dos van ser dissolts en una solució de 0,5% de carboximetilcel·lulosa – 0,1% Tween 80 (Sigma). Els fàrmacs preparats es guardaven a 4°C i en condicions de foscor durant dues setmanes.

El moment d'inici dels tractaments era la detecció d'una massa abdominal palpable, aproximadament 12-15 dies després de la implantació. Quan tots els ratolins presentaven tumor es randomitzaven aleatòriament en els diferents grups de tractament, tenint en compte possibles diferències de volum tumoral. Els tractaments finalitzaven quan els tumors dels animals del grup control (ja que eren els tumors que creixien més) afectaven al benestar dels animals. Els ratolins es sacrificaven per dislocació cervical.

En cap dels tractaments es va observar un efecte en el pes dels animals, i els animals es mantenien saludables i actius durant els tractaments.

Les administracions orals van ser realitzades utilitzant una sonda orogàstrica.

En l'experiment de lapatinib (apartat 1.1.2 de resultats):

Grup control: 7 animals, administrats amb solució vehicle oral i diària.

Grup lapatinib: 9 animals amb administració oral i diària de lapatinib 100 mg/kg.

Aquests animals van ser tractats durant 13 dies.

En l'experiment de pazopanib (apartat 2.1.1 de resultats):

Grup control: 9 animals, administrats amb solució vehicle oral i diària.

Grup pazopanib: 8 animals amb administració oral i diària de pazopanib 100 mg/kg.

Aquests animals van ser tractats durant 17 dies.

Experiment amb lapatinib, pazopanib i combinació de lapatinib-pazopanib (apartat 2.1.2 de resultats):

Grup control: 9 animals, administrats amb solució vehicle oral i diària. Dues administracions diàries per compensar l'administració en el grup combinació.

Grup lapatinib: 7 animals amb administració oral i diària de lapatinib 100 mg/kg. Una administració suplementària de vehicle per compensar l'administració en el grup combinació.

Grup pazopanib: 8 animals amb administració oral i diària de pazopanib 100 mg/kg. Una administració suplementària de vehicle per compensar l'administració en el grup combinació.

Grup combinació lapatinib – pazopanib: 6 animals amb administració oral i diària de lapatinib 100 mg/kg i de pazopanib 100 mg/kg.

Els animals van ser tractats durant 13 dies.

1.3.2 Esquema de tractament de l'experiment amb el TGT44

El TGT44 va ser tractat amb pazopanib i amb CDDP (cis-diclorodiamino platí), obtingut del departament de farmacologia de l'Institut Català d'Oncologia. Pazopanib va ser preparat en la mateixa solució vehicle esmentada anteriorment, i CDDP es dissolia en sèrum fisiològic.

Com en el TGT38 el tractament del TGT44 va començar quan es va detectar una massa intrabdominal palpable, i es va acabar quan el benestar dels animals de grup control es veia afectat. Degut a que el creixement d'aquest tumor era molt més lent que el del TGT38 els temps del tractament van ser molt diferents: es va començar a tractar 6 setmanes després de la implantació, i els animals es van tractar durant les 6 setmanes següents.

En cap dels tractaments es va observar un efecte en el pes dels animals, i els animals es mantenien saludables i actius durant els tractaments. Les administracions orals van ser realitzades utilitzant una sonda orogàstrica.

Grup control: tres animals es van administrar amb la solució vehicle de pazopanib de manera oral i diària, i amb administració intraperitoneal de 4 dosis de sèrum fisiològic, una cada set dies.

Grup CDDP: tres animals es van administrar intraperitonealment amb quatre dosis setmanals de 4 mg/kg de CDDP.

Grup pazopanib: quatre animals es van administrar amb pazopanib 100 mg/kg oralment i diàriament.

Cal afegir que el nombre d'animals per grup en aquest experiment és molt més baix degut a un problema que vam tenir en el creixement del tumor, que va créixer tant sols en un 50% dels ratolins. Així doncs de 18 animals implantats només 10 van presentar creixement inicial del tumor. Aquests són els que es van randomitzar en els tres grups de tractament.

1.4 Obtenció i processament de les mostres tumorals

Al punt final dels experiments es sacrificaven els animals de tots els grups el mateix dia, mitjançant dislocació cervical. A continuació es procedia a pesar i mesurar la llargada i l'amplada del tumor amb un peu de rei. Per obtenir resultats de volum tumoral es va utilitzar la fórmula següent: $volum = llargada \times (amplada^2 / 2)$.

De cada peça tumoral es guardaven mostres congelades a -80°C per una posterior obtenció d'RNA o proteïna; mostres congelades a -80°C en OCT (Tissue-Tek® Sakura) per obtenir posteriorment talls congelats i realitzar immunofluorescències; i peces

tumorals que s'inclouïen en parafina per realitzar immunohistoquímiques o tincions d'hematoxilina-eosina. El protocol d'inclusió en parafina consistia en una primera fase de fixació dels tumors en formol 4% durant 24 hores, i una posterior deshidratació, on les peces tumorals passaven per una bateria d'alcohols i finalment xilol (1 hora en etanol 70%, 1 hora en etanol 96%, O/N en etanol 96%, 1h 30' en cada un dels passos següents: 3 alcohols de 100%, i xilol), per acabar en un bany de parafina líquida a 60°C O/N (over-night). Les mostres es guardaven posteriorment en la parafina refredada i sòlida.

1.5 Càlcul del coeficient de combinació

En l'experiment on es van tractar els ratolins amb lapatinib, pazopanib i la combinació d'ambdós fàrmacs, vam calcular el coeficient de combinació per analitzar si l'administració combinatòria dels dos fàrmacs tenia efectes sinèrgics o no (Guerin et al., 2008).

El coeficient de combinació (CC) és la relació entre la fracció del volum tumoral (FTV) esperada del tractament amb els dos fàrmacs administrats individualment respecte la FTV observada en els ratolins tractats amb administració conjunta dels dos fàrmacs. La FTV esperada de la combinació és el producte de les dues FTVs observades amb els tractaments individuals, és a dir que la $FTV_{(lapa.+pazo.)esperada} = FTV_{lapa.observada} \times FTV_{pazo.observada}$. Així doncs ens queda que:

$$CC = \frac{FTV_{(lapa.+pazo.)esperada}}{FTV_{(lapa.+pazo.)observada}} = \frac{(FTV_{(lapa.)observada} * FTV_{(pazo.)observada})}{FTV_{(lapa.+pazo.)observada}}$$

De manera que quan $CC > 1$ es pot parlar d'efectes supra-additius del tractament combinatori de dos fàrmacs respecte el tractament individual amb cada un d'ells.

2 CULTIUS CEL·LULARS

En aquest estudi hem realitzat experiments *in vitro* amb 4 línies cel·lulars testiculars diferents: les 1411H (Vogelzang et al., 1985), d'origen de sac vitel·lí es van obtenir d'ECACC (*European Collection of Cell Cultures*-Sigma-Aldrich). Les 833K de carcinoma embrionari i teratoma (Bronson et al., 1980); les GCT27S de component de carcinoma

embrionari (Pera et al., 1987) i la seva parella amb resistència adquirida a CDDP, les GCT27R (Kelland et al., 1992); i les SuSaS de carcinoma embrionari i teratoma (Hogan et al., 1977), amb la seva parella de resistència a CDDP adquirida SuSaR (Walker et al., 1990), van ser obtingudes del Dr. Yong-Jie Lu (Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London). Les GCT27 i les SuSa van ser validades per la ECACC amb el mètode de genotipat per microsatèl·lits.

2.1 Manteniment de les línies cel·lulars en cultiu

Les 1411H, les GCT27S, les GCT27R i les 293FT es van mantenir en cultiu amb medi DMEM (Gibco[®]) suplementat amb 10% FBS (sèrum fetal boví) inactivat, 50 unitats/ml de penicilina, 50 µg/ml d'estreptomicina, 2 mM glutamina i 2 mM piruvat sòdic. Les SuSaS, les SuSaR i les 833K es van mantenir en cultiu amb medi RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementat amb 20% FBS inactivat, 50 unitats/ml de penicilina, 50 µg/ml d'estreptomicina, 2 mM glutamina i 2 mM piruvat sòdic.

En tots els casos les cèl·lules van ser cultivades en condicions constants d'atmosfera al 5% de CO₂ i a una temperatura de 37°C.

2.2 Producció de constructes lentivirals shRNA per a ErbB3 i PDGFRβ

Els lentivirus produïts van ser els de MISSION[®]-shRNA de SIGMA, i es van comprar en format de bacteris en glicerol. Aquests bacteris es van fer créixer en LB amb ampicilina (50 µg/ml), i posteriorment, per obtenir el plasmidi a transfectar, es va fer una *maxiprep* amb el kit de QUIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit.

Per produir els constructes lentivirals vam fer una triple transfecció de 293FT, amb el plasmidi empaquetador pSPAX.2, el plasmidi embolcall pMD2.G i el plasmidi lentiviral amb la seqüència shRNA basat en pLKO.1 (Sigma). Les cèl·lules es van transfectar amb polyethulenimine (PEI) (25 kDa, linear, powder (Polysciences Inc.), partint d'una solució 1 mg/ml en una solució 20mM HCl, 10 mM NaOH a pH 7 filtrada a 0,22 µm.

Per cada virus que es volia produir vam transfectar una placa de 15 cm de diàmetre de cèl·lules 293FT. En cada placa vam transfectar 5,4 µg de pMD2.G, 16,8 µg de pSPAX.2

i 22,5 µg de pLKO.1. Els plasmidis es van mesclar en 1,25 ml de NaCl 150 mM, i es van barrejar amb 1,25 ml de solució d'1/5 de PEI en NaCl 150 mM prèviament preparada i incubada durant 5 minuts. La mescla d'ambdues solucions es va deixar reposar a temperatura ambient i es va afegir a la placa de 293FT gota a gota. El medi de transfecció es va deixar O/N i posteriorment es va fer un canvi de medi, per medi normal.

24 hores després de l'últim canvi de medi es va recollir el medi, que contenia ja els virus i es va procedir a la concentració d'aquests. Per a això es va fer una primera centrifugació a 500 G de 2' a 4°C, per descartar les restes cel·lulars. El sobrenedant es va filtrar a 0,45 µm i es va centrifugar a 20.000 rpm's, 90' a 4°C, en la ultracentrífuga (Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter). Per decantació es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre el pèl·let en 200 µl de PBS1X, es van incubar en gel 30' i els concentrats virals es van aliquotar i guardar a -80°C. La producció dels lentivirus es va dur a terme en una sala de cultius equipada amb aquesta finalitat en les instal·lacions d'IDIBELL. Els virus produïts van ser els següents:

Virus	Gen	ID del clon	Seqüència shRNA
shErbB3.1	ErbB3	NM_001982.x-4160s1c1	CCGGCTGCCTTTGATAACCCTGATTCTCGA GAATCAGGGTTATCAAAGGCAGTTTTT
shErbB3.2	ErbB3	NM_001982.x-3982s1c1	CCGGTATATGAATCGGCAACGAGATCTCG AGATCTCGTTGCCGATTCATATATTTTTG
shPβ4	PDGFRβ	NM_002609.x-951s1c1	CCGGGTGGATTCTGATGCCTACTATCTCG AGATAGTAGGCATCAGAATCCACTTTTT
shPβ5	PDGFRβ	NM_002609.x-2916s1c1	CCGGGACTCGAATTACATCTCCAAACTCGA GTTTGGAGATGTAATTCGAGTCTTTTT
EV	Control negatiu	SHC001- pLKO.1-puro empty vector	Sense seqüència shRNA

Taula M1. Detalls dels lentivirus shErbB3 i shPDGFRβ generats.

2.3 Generació de línies cel·lulars estables transduïdes amb els vectors lentivirals shErbB3 i shPDGFR β

Un cop produïts els vectors lentivirals es va procedir a la generació de línies estables. Per transduïr les cèl·lules amb els vectors lentivirals es van sembrar en plaques de pous de 6, quan es trobaven a una confluència del 60% es va procedir a la transducció. Vam canviar el medi per medi fresc suplementat amb polibré (Santa Cruz Biotechnology, inc) 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 5 hores, i a continuació es van afegir 50 μl dels virus concentrats gota a gota. Es van deixar O/N i l'endemà es va canviar el medi per medi fresc normal. No va ser fins 48 hores post-transducció que es va afegir la puromicina (Sigma) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per tal de seleccionar les cèl·lules infectades, ja que el plasmidi pLKO.1 porta el gen de resistència a la puromicina i confereix aquesta resistència a les cèl·lules infectades. La dosi de puromicina va ser escollida havent fet prèviament una corba de dosi-resposta a l'antibiòtic.

Les cèl·lules es van mantenir sempre en presència de puromicina i es van anar expandint a mesura que van anar creixent.

En el cas dels vectors lentivirals shErbB3 es van transduïr els virus shErbB3.1, shErbB3.2 i EV en les cèl·lules SuSaS i GCT27S. En el cas dels vectors lentivirals shPDGFR β (shP β) es van transduïr els virus shP β 4, shP β 5 i EV en les cèl·lules GCT27S i GCT27R.

2.4 Assaig de viabilitat cel·lular per incorporació de MTT

La viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant l'assaig d'incorporació de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazoli) (Sigma). Aquest assaig consisteix en un mètode colorimètric basat en les característiques que tenen les sals de tetrazoli, com l'MTT, de fragmentar-se donant lloc a un derivat del formazà insoluble en medi aquós. Aquesta fragmentació es produeix mitjançant una reacció enzimàtica catalitzada per l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa, activa únicament en les cèl·lules vives i metabòlicament actives. És una tècnica que mesura l'activitat metabòlica de les cèl·lules (Berridge et al., 2005) i que podem relacionar amb viabilitat cel·lular.

Els assajos es van realitzar en plaques de 96 pous en les que es va sembrar un nombre de cèl·lules conegut (1000-1200 cèl·lules / pou). 24 hores després es canviava el medi

per medi amb el tractament corresponent. Les cèl·lules es mantenien durant 4 dies amb el tractament (medi renovat al cap de dos dies). Un cop acabat el tractament s'afegien 45 µl d'MTT 5 mg/ml a cada pou i s'incubava la placa a 37°C durant 4 hores en condicions de foscor. A continuació es treia el medi, obtenint el precipitat de formazà adherit al fons dels pous de la placa de 96. Aquest precipitat es resuspensia en 100 µl de DMSO i l'absorbància es llegia a 570 nm en un lector de plaques. Els resultats es van expressar en percentatge, on el valor del 100% correspon a l'absorbància de les cèl·lules control, sense inhibidors.

Les corbes en les que afegíem fàrmac diluït en DMSO vam fer dilucions 1/1000, dosis en les que no s'observava toxicitat de DMSO.

En el cas de les corbes de sensibilitat a CDDP les dosis es mostren en escala logarítmica, essent la dosi de -2 de CDDP, $1 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

Totes les corbes s'han realitzat amb tres o quatre duplicats, i la representació i l'anàlisi de les IC50s i significativitat s'ha realitzat amb el programa informàtic GraphPad Prism 6.

2.5 Anàlisi del creixement de les cèl·lules SuSa-shErbB3

Per analitzar el creixement de les cèl·lules SuSa-shErbB3 es van sembrar 15.000 cèl·lules en pous de placa de 24 i es va comptar el nombre de cèl·lules al cap de 2, 3, 4 i 7 dies.

Les cèl·lules es van comptar fent servir una Cambra de Neubauer i *trypan blue* per comptar només les cèl·lules vives.

2.6 Tumors generats de les línies cel·lulars SuSa-EV i SuSa-shErbB3.2

Les cèl·lules SuSa-EV i les SuSa-shErbB3.2 es van resuspendre en PBS1X a una concentració de $4,3 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. Immediatament es van punxar 1,7 milions de cèl·lules en cada testicle de tres ratolins per línia cel·lular. Per punxar-les, els ratolins es

van sotmetre a cirurgia, anestesiant i fent una incisió laparotòmica tal com s'ha explicat en l'apartat 1.1 de materials i mètodes.

Al cap de 36 dies, tots els animals presentaven creixement de tumor. Després de sacrificar els animals, els tumors SuSa-EV i SuSa-shErbB3 es van implantar ortotòpicament, tal i com s'explica en l'apartat 1.1 de materials i mètodes, en els testicles de 5 ratolins per a cada línia tumoral. 38 dies post-implantació es van sacrificar els ratolins i es van analitzar els volums tumorals de cada línia tumoral.

2.7 Inhibidors i factors de creixement utilitzats *in vitro*

En les GCT27R es van testar diferents inhibidors, tots van ser dil·luïts en DMSO: Pazopanib i Lapatinib de GlaxoSmithKline, Sunitinib de Pziser, Gefitinib de AstraZeneca, Ly2109762 cedit per Eli Lilly, i Ly294002 i UO126 (Calbiochem).

Les GCT27, un cop depleccionades O/N amb medi sense sèrum, es van estimular durant 10 minuts amb els factors de creixement PDGF-BB (R&D), FGF-2 (R&D) i EGF (Sigma). Un cop acabat aquest període es van lisar ràpidament per obtenir el lisat proteic.

3 ESTUDIS HISTOLÒGICS DE LES MOSTRES TUMORALS

3.1 Immunofluorescències

Per estudiar la vasculatura, la proliferació cel·lular i l'apoptosi vam analitzar l'expressió de CD31, Ki67 i TUNEL respectivament, per immunofluorescència. Es van utilitzar seccions de 3 µm de teixits congelats en OCT.

Un cop realitzades les immunofluorescències es va procedir a l'anàlisi dels resultats. Les imatges de les immunofluorescències de CD31 i Ki67 en el TGT38 es van obtenir en el microscopi confocal Leica TCS SL. Les imatges de TUNEL i dels receptors ErbB1 i ErBB2 en el TGT38, i les imatges de CD31 en el TGT44 es van obtenir en el microscopi de fluorescència Olympus-BX60.

L'expressió de CD31, Ki67 i TUNEL es va valorar en sis imatges de tumor viable a un augment de 400x per a cada tumor independent. La quantificació es va realitzar utilitzant el programa Imatge J, excepte en el cas de CD31 en el TGT44 que es va utilitzar el programa Volocity[®]. Per valorar l'expressió de CD31 es van quantificar el nombre d'estructures vasculars en cada imatge i el percentatge d'àrea positiva per CD31. En el cas de Ki67 i TUNEL es van quantificar els nuclis de les cèl·lules positives per a aquests dos marcadors respecte el nombre de nuclis totals en cada imatge valorada.

3.1.1 Marcatge amb CD31 i Ki67

Per analitzar la vasculatura dels tumors vam analitzar l'expressió del marcador de cèl·lules endotelials CD31, i per estudiar la proliferació de les cèl·lules tumorals vam utilitzar el marcador de proliferació Ki67.

Les seccions de teixit congelat es van deixar temperar durant 15 minuts i a continuació es van fixar en formol tamponat al 10% durant 10 minuts. Els talls es van sotmetre a 5 rentats ràpids, de dos minuts, en aigua destil·lada, i tres més de PBS1X-0,1% Tritó X-100 (PBS 10X: 1,5 M NaCl, 90 mM Na₂HPO₄ i 10 mM KH₂PO₄). La incubació dels anticossos primaris es va realitzar durant tota la nit a 4°C en una cambra humida. Les concentracions dels anticossos primaris es detalla a la Taula M2.

	Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
PRIMARIS	CD31/PECAM	BD Pharmingen	Monoclonal de rata	1:50
	Ki67	NeoMarkers	Policlonal de conill	1:100
SECUNDARIS	Alexa Fluor-488 anti-rata	Molecular Probes	Cabra	1:200
	Alexa Fluor-546 anti-conill	Molecular Probes	Cabra	1:200

Taula M2. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les immunofluorescències de CD31 i Ki67 de les seccions de teixits tumorals.

En cas de voler fer doble marcatge, aquests dos anticossos primaris s'incubaven conjuntament.

Després de la incubació de l'anticòs primari, les seccions es van rentar tres vegades amb PBS1X-0,1% Tritó X-100, abans però es van deixar temperar mitja hora. La incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar durant una hora a temperatura ambient en condicions de foscor. Les concentracions d'anticòs es detallen a la Taula M2. Després de tornar a rentar tres vegades amb PBS1X-0,1% Tritó X-100 les mostres es van muntar amb medi de muntatge amb DAPI (VectaShield®), que marcava els nuclis de les cèl·lules.

3.1.2 Detecció de mort cel·lular amb marcatge de TUNEL

Per identificar les cèl·lules apoptòtiques vam utilitzar el mètode de la detecció *in situ* del DNA fragmentat o tècnica de TUNEL (de l'anglès, terminal *deoxynucleotidyl transferase-mediated biotina-dUTP nick end labeling*; Promega). Aquest mètode detecta els extrems 3'-OH lliures que es generen en la fragmentació del DNA típica en l'apoptosi, mitjançant la unió a aquests extrems de nucleòtids marcats, gràcies l'enzim transferasa terminal (TdT).

Les seccions de teixit congelat es van deixar temperar 15 minuts a temperatura ambient, i a continuació es van fixar amb formol tamponat 10% durant 10 minuts. Com en les altres immunofluorescències vam procedir a fer varis rentats amb aigua destil·lada i tres rentats de 10 minuts amb PBS1X-0,1% Tritó X-100. Les mostres es van tractar segons el protocol especificat per la casa comercial; es van incubar amb la solució d'equilibrat durant 10 minuts a temperatura ambient i posteriorment amb la barreja de rTdT a 37°C durant 1 hora dins la cambra humida. Un cop passada aquesta incubació es va fer un rentat de 15 minuts amb SCC 2X; dos rentats de PBS1 de 5 minuts i un últim amb PBS1X-0,1% Tritó X-100. A continuació vam incubar les mostres amb una dilució 1:500 d'estreptavidina 488 FITC (Molecular Probes) durant 1 hora a temperatura ambient i tapat de la llum dins la cambra humida. Finalment les mostres es van rentar tres cops amb PBS1X-0,1% Tritó X-100, i es van muntar utilitzant el medi amb DAPI (VectaShield®).

3.1.3 Doble marcatge d'ErbB1 i ErbB2

Per analitzar la localització d'ErbB1 i ErbB2 en el TGT38 vam realitzar una co-immunofluorescència amb els dos receptors. Seccions de tumor TGT38 congelades en OCT es van temperar durant 15 minuts, es van fixar amb formol tamponat 10% durant 3 minuts, es va fer un rentat amb aigua destil·lada de 5 minuts i tres rentats de 5 minuts de PBS1X-0,1% Tritó X-100. Es va realitzar un bloqueig d'1 hora a temperatura ambient utilitzant la solució de bloqueig del *Vector® M.O.M Immunodetection Kit Fluorescein*, especialitzat per realitzar immunofluorescències en teixit de ratolí utilitzant anticossos de ratolí. Després de dos rentats amb PBS1X-0,1% Tritó X-100, vam procedir a fer el bloqueig de 10 minuts d'avidina biotina (DAKO) segons el *kit*. Els anticossos primaris es van incubar durant la nit a 4°C en la cambra humida, les concentracions estan detallades a la taula M3.

	Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
PRIMARIS	EGFR (528) sc-120	Santa Cruz Biotechnology, inc	Policlonal de conill	1:30
	Neu-SC18 (ErbB2)	Santa Cruz Biotechnology, inc	Policlonal de conill	1:30
SECUNDARIS	Biotinilated anti-mouse IgG reagent	<i>Vector® M.O.M Immunodetection Kit</i>		1:250
	Alexa Fluor-546 anti-conill	Molecular Probes	Cabra	1:250

Taula M3. Anticossos/reactius primaris i secundaris utilitzats en la immunofluorescència de doble marcatge de ErbB1 i ErbB2.

L'endemà es van temperar les mostres 15 minuts, es van realitzar tres rentats amb PBS1X-0,1% Tritó X-100, i es van incubar a les fosques durant 1 hora a temperatura ambient els reactius/anticossos secundaris diluïts en el diluent del *Vector® M.O.M Immunodetection Kit Fluorescein*. Les dades dels secundaris estan detallades a la taula M3.

Un cop acabada aquesta incubació es van fer dos rentats amb PBS1X-0,1% Tritó X-100 i es van incubar les mostres durant 5 minuts, a temperatura ambient i a les fosques, amb la Fluorescina Avidina DCS del *Vector® M.O.M Immunodetection Kit Fluorescein*. Ja per

acabar es van fer tres rentats de 5 minuts amb PBS1X-0,1% Tritó X-100 i les mostres es van muntar utilitzant medi de muntatge amb DAPI (VectaShield®).

3.3 Tinció hematoxilina-eosina

Les mostres de tumors que es van voler analitzar amb la tinció d'hematoxilina-eosina (H&E) es van incloure en parafina i es van tallar en seccions de 3-5 µm.

Primer de tot es va fer la desparafinació que consistia en seguir una bateria de 10 minuts en 4 xilols, i 5 minuts en 3 etanols absoluts, 3 etanols de 96% i un etanol de 70%. Després de l'últim alcohol les mostres es van rentar 5 minuts amb aigua destil·lada i es van tenyir amb Hematoxilina de Harris sucant uns 10-15 segons. Per treure l'hematoxilina les mostres es van rentar amb aigua de l'aixeta abundant, es van tenir durant 2 segons amb HCl al 0,5% i 2 segons més en aigua amoniacal (200 ml d'aigua destil·lada amb un 1 ml d'amoniac al 30%). Les mostres es van tornar a rentar amb aigua de l'aixeta i a continuació es van tenyir 5-10 minuts amb eosina (2,5 g d'eosina en 1 litre d'etanol al 50%). A continuació es va procedir a deshidratar les mostres seguint una bateria de cinc minuts en tres etanols de 96%, tres d'etanol absolut i deu minuts en quatre cubetes de xilols. Les mostres es van muntar amb un cobreix objectes i DPX (Merck).

3.4 Quantificació d'àrees necròtiques tumorals

Imatges de tumors TGT38 del grup control o lapatinib tenyits amb H&E es van obtenir en una lupa binocular NIKON SMZ800 i amb el programa NIS-ELEMENTS. Amb el programa Image J es van quantificar les àrees necròtiques i es va calcular el percentatge que representaven respecte l'àrea total del tumor.

3.5 Immunohistoquímiques

3.5.1 Immunohistoquímica d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3

Es van obtenir seccions de 3 µm de talls parafinats de TGT12, TGT1 i TGT38 i els seus respectius tumors primaris i es va procedir a desparafinar com hem comentat abans, a part de realitzar també una tinció H&E en cada un d'ells.

Aquestes immunohistoquímiques es van realitzar en col·laboració amb els departaments d'anatomia patològica de l'Hospital de Bellvitge i de l'Hospital de la Vall d'Hebrón.

La permeabilització es va realitzar amb saponina per la tinció d'ErbB1, i amb pepsina per la tinció d'ErbB2. El desemascament d'antigen es va realitzar utilitzant la solució d'elevat pH de DAKO (K8004). Les seccions es van incubar 5 minuts amb el reactiu de bloqueig de la peroxidasa (SM801), a continuació es van incubar 20 minuts amb els anticossos primaris (Taula M4). A continuació es van incubar amb l'anticòs secundari de ratolí *DAKO envision + System HRP*, i la detecció es va realitzar amb el sistema de *DAB+ chromogen system* (DAKO). Es va contrastar amb hematoxilina i les mostres es van deshidratar (bateria de cinc minuts en tres etanols de 96%, tres d'etanol absolut i deu minuts en quatre cubetes de xilols) i muntar amb DPX (Merck).

La immunohistoquímica d'ErbB3 es va realitzar segons Sanchez-Martin *et al.* (Sanchez-Martin and Pandiella, 2012).

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
ErbB1	Zymed Lab. 31G7	Monoclonal de ratolí	1:50
ErbB2	Novocastra, NCL-L-CB11	Monoclonal de ratolí	1:100
ErbB3	(Sanchez-Martin and Pandiella, 2012)	Policlonal de conill	(1:75)

Taula M4. Anticossos primaris utilitzats en immunohistoquímica d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3.

3.5.2 Caracterització del TGT44

La caracterització del TGT44 es va fer en col·laboració amb el Dr. August Vidal del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge.

Es van obtenir seccions de 3 µm de talls parafinats del TGT44, el TGT44 tractat amb CDDP i del tumor primari originari. A part de tenyir aquestes mostres amb H&E per analitzar la morfologia es va realitzar també una caracterització immunohistoquímica.

Per a les immunohistoquímiques amb AFP i c-KIT el desemmascarament d'antigen es va realitzar utilitzant la solució d'elevat pH de DAKO (K8004), i per a les de CaM6.2 i EMA es va fer a 95°C 20 minuts. Les seccions es van incubar 5 minuts amb el reactiu de bloqueig de la peroxidasa (SM801), a continuació es van incubar 20 minuts amb els anticossos primaris (Taula M5) i 20 minuts més amb el reactiu de detecció EnVision™FLex+ (Dako, Glostrup, Denmark, K8002), 10 minuts amb la barreja tal com especifica el comercial d'EnVision™FLex+ DAB+ Chromogen (DM827) i solució substrat EnVision™ FLEX (SM803), i 5 minuts més amb l'hematoxilina EnVision™ FLEX (K8008). Per acabar les mostres van seguir una bateria de cinc minuts en tres etanols de 96%, tres d'etanol absolut i deu minuts en quatre cubetes de xilols. Les mostres es van muntar amb DPX (Merck).

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
EMA (E29)	Dako (M0613)	Monoclonal de ratolí	1:200
CaM6.2	Becton Dickinson (345779)	Monoclonal de ratolí	(ready to use)
AFP	Dako (IR500)	Policlonal de conill	(ready to use)
c-KIT (CD117)	Dako (A4502)	Policlonal de conill	1:750

Taula M5. Anticossos primaris utilitzats en immunohistoquímica per la caracterització de TGT44.

3.5.3 Immunohistoquímica de PDGFR β

L'expressió de PDGFR β es va analitzar per immunohistoquímica en el TMA (de l'anglès *tissue micro array*) de testicle, realitzat per el servei d'Anatomia Patològica de Bellvitge. El TMA consistia en 8 porta-objectes amb mostres de teixits de pacients afectats de càncer testicular amb diferents pronòstics i resposta a CDDP i diferents components histològics. Tenint en compte que hi havia pacients que presentaven més d'un component, o bé hi havia més d'una biòpsia, el TMA constava de 74 pacients sensibles a CDDP i 23 resistents a CDDP.

Aquests porta-objectes, ja que tenien una capa més gruixuda de parafina per protegir-los, es van desparafinar a 65°C tota una nit sencera. L'endemà es van submergir 10 minuts en xilol a 65°C i a continuació es va procedir a fer la desparafinació convencional, que constava de 4 passos de 10 minuts en xilols, i 5 minuts en 3 etanols absoluts, 3 etanols de 96% i un etanol de 70%. Després de l'últim alcohol les mostres es van rentar 5 minuts amb aigua destil·lada i es va realitzar el desemascament d'antigen amb citrat 1X a pH 6 durant 2 minuts en una olla a pressió. A continuació les mostres es van deixar refredar 20 minuts, es van rentar altra vegada amb aigua destil·lada i es van desactivar les peroxidases endògenes 10 minuts en aigua oxigenada (H₂O₂) 3%. Seguidament es van rentar les mostres amb aigua destil·lada i tres rentats amb PBS1X-0,1% Tritó X-100, es van bloquejar amb sèrum de cabra diluït 1:50 en PBS1X mitja hora a temperatura ambient, i es van incubar amb l'anticòs primari PDGFR β (P-20 de Santa Cruz Biotechnology, INC) diluït 1:20 en PBS1X tota la nit a 4°C, dins la cambra humida. L'endemà, després de temperar les mostres durant mitja hora, es van rentar tres vegades amb PBS1X-0,1% Tritó X-100 i es van incubar mitja hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari anti-conill d'EnVisionTMFLex (Dako). Després de tres rentats amb PBS1X-0,1% Tritó X-100 es va revelar amb el reactiu de revelatge d'EnVisionTMFLex DAB tres minuts en cada tall. Per aturar la reacció es van rentar les mostres amb aigua de l'aixeta, i a continuació per tenyir els nuclis de les cèl·lules vam tenyir amb hematoxilina de Harris i vam procedir a fer la deshidratació seguint la bateria d'etanols i xilols (3 etanols de 96%, 3 etanols absoluts, 4 xilols). Les mostres es van muntar amb un cobreix-objectes i DPX (Merck).

4 PROCESSAMENT DE MOSTRES PROTÈIQUES

4.1 Extracció proteica

4.1.1 Extracció proteica de teixits tumorals

L'extracció de proteïnes de les mostres tumorals es realitzava de peces tumorals d'uns 4x4 mm trossejat en fresc o congelat (en aquest últim cas el tall es realitzava sobre neu carbònica per evitar la descongelació). La peça de tumor es disgregava mecànicament amb l'ajuda d'un politró en 700 µl de solució de lisi RIPA (0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% sodi deoxicolat) amb inhibidors de proteases (100 µM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) , 0,1 µg/µl benzamidina, 1 µM pepstatina A, 5 µg/ml leupeptina i 2 µg/ml aprotina) i inhibidors de fosfatases (10 mM NaF, 40 mM β-glicerofosfat, 100 µM ortovanodat sòdic). Els lisats s'incubaven una hora a 4°C en agitació i seguidament es centrifugaven les mostres durant 15 minuts a 12.000 rpm a 4°C. Els sobrenedants es quantificaven i es conservaven a -20°C.

La quantificació proteica de les mostres es realitzava mitjançant el *kit BCA protein assay kit* (Pierce), un mètode colorimètric de quantificació de proteïnes, seguint les instruccions del fabricant.

4.1.2 Extracció proteica de cultius cel·lulars

Per extraure proteïnes de cultius cel·lulars es rentaven les cèl·lules tres vegades amb PBS1X fred, aspirant molt bé en l'últim rentat. Amb la placa sobre gel s'afegia la solució de lisi (0,2% NP-40, 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl i 10% glicerol) amb els mateixos inhibidors de proteases i fosfatases esmentats en l'apartat anterior, sobre la placa i es deixava 15 minuts a 4°C. A continuació es lisaven amb un *cell scrapper*, es centrifugava el lisat a 14 000 xG durant 10 minuts a 4°C i el sobrenedant es quantificava i es guardava a -20°C. La quantificació proteica de les mostres es realitzava mitjançant el *kit BCA protein assay kit* (Pierce).

4.2 Immunoprecipitació

Es van realitzar immunoprecipitacions d'ErbB1 i ErbB2 en lisats proteics de tumors TGT38 acabats de realitzar tal com hem esmentat a l'apartat 4.1.1, sense haver-los congelat prèviament. Els lisats tumorals (750 µg de proteïna total) es van incubar 1 hora a 4°C en agitació orbital amb boles de sefarosa-A i -G (1:1) (GE, Healthcare), per fer el *pre-clean*. Aquestes boles es van descartar després d'una centrifugació a 500 xG, 5 minuts a 4 °C, i els lisats es van incubar a 4°C, en agitació orbital tota la nit amb 1,6 µg d'anticòs monoclonal de ratolí anti-ErbB1 (Santa Cruz Biotechnology, INC), 1,6 µg d'anticòs policlonal de ratolí anti-ErbB2 Neu (sc18): SC-284 (Santa Cruz Biotechnology, INC), o sense anticòs, com a control negatiu. L'endemà els lisats es van incubar durant 6 hores, a 4°C i en agitació orbital, amb boles de sefarosa amb proteïna-A i -G (1:1) (GE, Healthcare) prèviament rentades amb RIPA. Per fer baixar les boles les mostres es van centrifugar a 500 xG 4°C i 5 minuts i es van rentar 5 vegades amb RIPA. Les mostres es van desnaturalitzar afegint la solució amb SDS per carregar mostres en gels d'electroforesi (SPLB) 2X i es van bullir a 95°C. A continuació els immunoprecipitats es van analitzar per *western blot*, com es descriu a continuació.

4.3 Electroforesi en gels de poli-acrilamida/SDS i *western blot*

4.3.1 SDS-Page i transferència de proteïnes

L'electroforesi en gels de poli-acrilamida (acrilamida/bisacrilamida (29:1)) en presència del detergent dodecilsulfat sòdic (SDS) o tècnica coneguda també com a SDS-PAGE (de l'anglès sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis) permet separar les proteïnes segons la seva grandària. Són gels que consten de dues parts; el gel empaquetador, que permet que les proteïnes entrin alhora a la següent fase del gel; i el separador que separa les proteïnes segons la seva grandària. Per evitar que influeixin altres característiques com la càrrega, o l'estructura terciària o quaternària de les proteïnes, el procés es realitza en condicions desnaturalitzants, afegint SDS i l'agent reductor β-mercaptoetanol.

El gel separador és el que es troba a la part inferior i és el que es prepara en primer lloc. El percentatge d'acrilamida en aquest gel es variable, i s'escull segons el pes molecular de les proteïnes d'interès. Aquesta gel es preparava utilitzant una solució

9,4 M Tris base pH 8,8, 0,1% SDS, 1% APS i 0,1% TEMED, i com ja hem comentat un % d'acrilamida que es compensava amb aigua destil·lada. Els gels realitzats oscil·laven entre 7,5% i 12% d'acrilamida. Era important aplicar una fina capa d'aigua per sobre per tal que la base superior del gel quedés recta. Un cop polimeritzat el gel separador s'afegia el gel empaquetador compost per 4% d'acrilamida, 125 mM de Tris base pH 6,8, 0,1% SDS, 1% APS i 0,1% TEMED. Abans que solidifiqués es col·locava una pinta que formava els pous on es carregarien les mostres.

Les mostres que s'havien de carregar es preparaven igualant volums i quantitats de proteïna total en la solució de lisi utilitzada i tampó de càrrega 4X (60 mM Tris-HCL pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 0,01% blau de bromofenol i 5% β -mercaptoetanol). A continuació s'incubaven 5 minuts a 95°C, per afavorir la desnaturalització de les proteïnes (que ja s'afavoria amb la presència de SDS i β -mercaptoetanol presents en el tampó de càrrega). La quantitat de proteïna a carregar sempre era igual entre les mostres que s'havien de comparar, i aquesta podia oscil·lar d'entre 25 a 50 μ g. Es carregava sempre un marcador de proteïna comercial per tal de conèixer el pes molecular de les bandes.

Un cop carregades les mostres en el gel, aquest es col·locava en tampó d'electroforèsi 1X (25 mM Tris HCl pH 8,3, 192 mM Glicina i 17 mM SDS), dins d'una cubeta on el pol positiu es trobava a la part inferior, i quan s'aplicava una corrent elèctrica de 100-120V les proteïnes migraven entrant dins el gel.

Un cop separades les proteïnes en el gel d'acrilamida vam transferir les proteïnes a membranes de PVDF (polivinilideno fluoreide; inmobilon Millipore), prèviament activades 1 minut en metanol. Es realitzava un muntatge en sandvitx, en el que el gel i la membrana es trobaven en contacte directe, envoltats per esponges i paper whatman. Tot subjecte per un suport de plàstic i submergit en tampó de transferència (25 mM Tris base, 192 mM glicina i 10 % metanol), col·locat de manera que la membrana quedava al pol positiu, així quan aplicàvem una corrent elèctrica de 100V, durant 1 hora i mitja, les proteïnes migraven del gel a la membrana.

4.3.2 Western blot

Un cop realitzada la transferència proteica es bloquejaven les membranes, amb llet en pols al 5% en TBS 1X (TBS 10X: 99 mM Tris base i 1,49 M NaCl) durant una hora

a temperatura ambient i en agitació. Aquest pas evitaria la unió inespecífica a la membrana dels anticossos que després utilitzaríem. A continuació les membranes s'incubaven amb els anticossos primaris, diluïts en llet en pols 1% en TBS1X, durant tota la nit, en agitació i a 4°C. Els anticossos utilitzats estan detallats a la taula M6.

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
pErbB1 Tyr 1173	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
EGFR (528) sc-120	Santa Cruz Biotechnology, INC	Policlonal de conill	1:500
pErbB2 Tyr 1248	Uptstate	Policlonal de conill	1/2000
Neu-SC18 (ErbB2)	Santa Cruz Biotechnology, INC	Policlonal de conill	1:200
pErbB3 Tyr 1289	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:500
ErbB3 C-17	Santa Cruz Biotechnology, INC	Policlonal de conill	1:500
ErbB4 C-18	Santa Cruz Biotechnology, INC	Policlonal de conill	1:500
pERK1/2	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
ERK1/2	(McKenzie and Pouyssegur, 1996)	Policlonal de conill	1/2000
pAKT Ser 473	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
AKT	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
pSTAT3 Tyr 705	Cell Signaling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
PDGFR α	R&D Systems	Policlonal de cabra	1:500
PDGFR β (P-20)	Santa Cruz Biotechnology, INC	Policlonal de conill	1:500
PTEN	Cell Signalling, Beverly, MA	Policlonal de conill	1:1000
α -Tubulina	Sigma Chemical	Monoclonal de ratolí	1:3000
β -Actina	Sigma Chemical	Monoclonal de ratolí	1:3000

Taula M6. Anticossos primaris utilitzats per western blot.

Després de rentar les membranes tres cops amb TBS1X – 0,1% Tritó X-100, vam incubar-les amb els anticossos secundaris corresponents (taula M7), units a peroxidases. Després d'una incubació d'una hora a temperatura ambient, es van rentar

les membranes tres cops més amb TBS1X – 0,1% Tritó X-100, i es va detectar el senyal utilitzant mètode quimioluminescent basat en l'oxidació del luminol per part de la peroxidasa unida a l'anticòs secundari (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences).

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
Conill HRP	Amersham Biosciences	Cabra	1:5000
Ratolí HRP	Amersham Biosciences	Cabra	1:5000
Cabra HRP	Dako	Conill	1:5000

Taula M7. Anticossos secundaris utilitzats per *western blot*.

4.3.3 Quantificació de l'expressió proteica analitzada per *western blot*

La senyal obtinguda en els *western blots*, relacionada amb l'expressió proteica, es va quantificar digitalitzant la imatge i utilitzant el programa QuantityOne.

5 ANÀLISIS DE MOSTRES D'RNA

5.1 Extracció d'RNA de mostres tumorals i cultius cel·lulars

L'extracció de RNA de mostres tant tumorals com de cultius cel·lulars es va realitzar utilitzant el *RNeasy mini kit* (Quiagen®) seguint les instruccions del fabricant.

5.2 Obtenció de cDNA per retrotranscripció

A partir de l'RNA obtingut de mostres de cèl·lules o bé de mostres tumorals vam procedir a l'obtenció de cDNA utilitzant el kit *High-capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems) i seguint el protocol indicat pel fabricant. Depenent de la concentració d'RNA obtinguda vam partir d'1-2 µg de RNA per cada mostra. Abans però, l'RNA es va córrer en un gel d'agarosa per validar la seva integritat i comprovar que no hi havia contaminació genòmica.

5.3 PCR quantitativa a temps real (RT-PCR)

L'RT-PCR és una PCR convencional amb capacitat de quantificar l'amplificació del producte gràcies a la utilització de fluoròfors, en el nostre cas el Sybergreen (Roche Molecular Biochemicals) que s'uneix al DNA de doble cadena, per tant al producte amplificat de la PCR. Com que el fluoròfor s'uneix inespecíficament a la seqüència, és molt important treballar amb condicions restringents i amb els controls negatius corresponents. Les corbes de desnaturalització o *melting* es van utilitzar per analitzar la qualitat dels resultats obtinguts.

Degut a que moltes de les mostres utilitzades en aquest estudi provenien de tumors ortotòpics, amb component humà i murí, els primers que es van utilitzar eren específics per a humans (Taula M8).

Per fer les RT-PCR vam utilitzar la barreja LC480 Sybgreen PCR mix (Roche®) que conté tots els reactius necessaris per a la realització de la RT-PCR excepte el DNA i els primers (Taq DNA polimerasa, tampó per la reacció, dNTPs, MgCl₂ i Sybgreen).

En cada pou d'una placa de 384 pous afegíem 100 ng de cDNA, 5 µl de la barreja amb Sybgreen, primers a 0,5 µM i aigua destil·lada fins a 10 µl finals. Les condicions de la PCR quantitativa van ser les següents: incubació inicial a 95°C durant 10 segons per activar la polimerasa, 45 cicles que consten de una primera fase de desnaturalització a 95°C durant 10 segons, l'anellament a 65°C (excepte hErbB1 que l'anellament es va realitzar a 61°C) durant 20 segons i l'extensió a 72°C durant 10 segons.

El resultat que s'obté de les RT-PCR són les corbes d'amplificació en les que es pot calcular la CT (*threshold cycle*) que és el cicle a partir del qual la fluorescència és estadísticament significativa per sobre el soroll de fons, i és inversament proporcional al nombre de còpies. En aquest estudi tots els anàlisis, si no s'especifica el contrari, els resultats es presenten en $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, on $\Delta\Delta Ct$ és el paràmetre on les Cts de cada mostra s'han normalitzat per la seva actina i relativitzat a una mostra indicada (com per exemple testicles normals o fenotip sensible a CDDP).

GEN	Seqüències
hErbB1	Fwd: 5'-GTCCCATAGTTGGACAGGATG-3' Rev: 5'-TCATCAGGGGAAATGCTCTT-3'
hErbB2	Fwd: 5'-AGGGGTCTTGATCCAGC-3' Rev: 5'-GGTTGGTGTCTATCAGTGTGA-3'
hErbB3	Fwd: 5'-GCTTGCTTTTCAGCCTGGCC-3' Rev: 5'-TTCTCAGCATCGCCGGTCAC-3'
hErbB4	Fwd: 5'-GTACAGTGCTGACCCACCG-3' Rev: 5'-AGGGTTCTCCTCCACTGGATTCA-3'
hPDGFRα	Fwd: 5'-AGTTCCTTCATCCATTCTGGACT-3' Rev: 5'-AATTGTAGTGTGCCACCTCTC-3'
hPDGFRβ	Fwd: 5'-CATCACCGTGGTTGAGAGC-3' Rev: 5'-AATTGTAGTGTGCCACCTCTC-3'
hPDGF-A	Fwd: 5'-TACTGAATTTGCGCCGCCACA-3' Rev: 5'-CCAAAGAATCCTCACTCCCTACG-3'
hPDGF-B	Fwd: 5'-TGTGCGGAAGAAGCCAATCT-3' Rev: 5'-AATAACCCTGCCACACACTC-3'
hActina	Fwd: 5'-GAGGCAGCCAGGGCTTA-3' Rev: 5'-AACTAAGGTGTGCACTTTTGTTCAACT-3'

Taula M8. Seqüències dels primers utilitzats per a reconèixer específicament l'expressió en mRNA de determinats gens.

6 ANÀLISIS ESTADÍSTICS

Tots els estudis estadístics s'han realitzat aplicant el test estadístic no paramètric U de Mann-Withney amb el programa SPSS o el GraphPad Prism. 6. En tots els casos les diferències s'han considerat estadísticament significatives quan * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ i s'ha representat amb aquesta nomenclatura en les figures.

BASES DE L'ESTUDI

L'estudi realitzat en aquesta tesi doctoral ha estat avaluar la teràpia dirigida a receptors ErbBs i la teràpia antiangiogènica en models murins de tumors testiculars humans ortotòpics.

L'estudi de la implicació dels receptors ErbBs en la biologia dels TGTs va ser iniciada en el nostre grup per la Dra. Wilmar Castillo Ávila. Tenint evidències descrites en la literatura de l'expressió d'aquests receptors en TGTs (Hechelhammer et al., 2003; Madani et al., 2003; Moroni et al., 2001), i evidències de la senyalització proangiogènica de TGF β a través d'ErbB1 en cèl·lules endotelials (Vinals and Pouyssegur, 2001), es va avaluar l'efecte *in vivo* de teràpies anti-ErbBs, en el coriocarcinoma TGT38, un model de tumor testicular altament vascularitzat. Malgrat els elevats nivells d'expressió d'ErbB1 els tractaments amb gefitinib o amb cetuximab, ambdós inhibidors purs d'ErbB1, no van afectar la progressió tumoral del TGT38. A punt final de tractament els volums dels tumors dels ratolins tractats amb cetuximab i amb gefitinib no es diferenciaven dels volums dels tumors del grup control tractat amb vehicle. Els anàlisis moleculars de la proliferació cel·lular i l'apoptosi en aquestes mostres tumorals no van mostrar diferències entre els grups, confirmant així l'absència d'efecte dels dos inhibidors d'ErbB1 sobre el tumor.

Per altra banda, en aquest estudi també vam voler continuar part de l'avaluació de la teràpia antiangiogènica en models de TGTs ortotòpics, estudi iniciat també per la Dra. Wilmar Castillo Ávila. Castillo-Ávila *et al.* (Castillo-Avila et al., 2009), van mostrar com el tractament amb sunitinib bloquejava el creixement tumoral en tres models de TGTs ortotòpics i augmentava la supervivència en un d'ells; efectes que es veien augmentats en el tractament combinatori de sunitinib i CDDP. A més a més també van mostrar l'eficàcia de sunitinib, i de la seva combinació amb CDDP, en bloquejar el creixement tumoral en un model ortotòpic amb resistència adquirida a CDDP. Havent obtingut resultats positius vam voler continuar aquesta avaluació amb un altre antiangiogènica, pazopanib, i en el context de la quimioresistència ja que és el principal problema en la clínica dels TGTs (Koychev et al., 2011).

OBJECTIUS

Els objectius generals d'aquest estudi han estat per una banda avaluar la teràpia amb inhibidors dels receptors ErbBs en models de tumor germinal testicular (TGTs). Com a objectius concrets en aquest apartat tenim doncs:

- a) Anàlisi de l'efecte de les teràpies anti-receptors ErbBs tant en el creixement tumoral com l'efecte a nivell molecular en el model tumoral TGT38.
- b) Avaluar la implicació dels receptors ErbBs en la supervivència cel·lular així com l'efecte de la inhibició d'aquests receptors *in vitro* en cèl·lules de tumors germinals testiculars.
- c) Avaluar l'efectivitat de la teràpia anti-receptors ErbBs combinada amb la teràpia anti-angiogènica en el tractament del TGT38.

Per altra banda un altre objectiu principal d'aquest estudi ha estat avaluar l'activitat antitumoral i antiangiogènica de pazopanib en el context de quimioresistència de tumors germinals testiculars (TGTs). D'aquest se'n deriven els següents objectius concrets:

- d) Avaluar l'efecte *in vivo* de pazopanib en models de TGTs i també en un nou model ortotòpic de TGT amb resistència intrínseca a CDDP, el TGT44.
- e) Analitzar l'activitat antitumoral de pazopanib *in vitro* en cèl·lules de tumors germinals testiculars aparellades amb sensibilitat i resistència a CDDP.
- f) Estudiar possibles mecanismes de resistència a CDDP en models de tumors germinals testiculars.

RESULTATS

1. TERÀPIES DIRIGIDES A RECEPTORS ErbBs

1.1 Avaluació de l'efecte *in vivo* de les teràpies dirigides a receptors ErbBs en un model ortotòpic murí de coriocarcinoma testicular humà

En un treball de tesi doctoral anterior al nostre, realitzat per la Dra. Wilmar Castillo Ávila, es va començar a estudiar la implicació d'ErbB1 en la biologia dels tumors testiculars i a avaluar la inhibició d'ErbB1 com a possible teràpia alternativa per als TGTs. Com ja hem comentat anteriorment, en aquell estudi es va avaluar l'efecte de gefitinib i de cetuximab, dos inhibidors purs d'ErbB1, en un model ortotòpic murí de coriocarcinoma testicular humà, el TGT38. Tot i que els resultats obtinguts mostraven que cap dels inhibidors afectava al creixement del volum tumoral, nosaltres vam analitzar aquestes mostres tumorals per tal de continuar l'estudi.

1.1.1 Cetuximab i gefitinib bloquejen la fosforilació d'ErbB1 però no afecten l'activació d'ErbB2

Per poder descartar que la falta d'efecte sobre el creixement tumoral era deguda a una ineficàcia de l'actuació dels inhibidors, vam comprovar que els dos fàrmacs havien bloquejat correctament l'activitat tirosina cinasa d'ErbB1. Per això vam mesurar per *western blot* els nivells de fosforilació en la tirosina 1173 d'ErbB1, una de les tirosines més fosforilades en l'activació general d'aquest receptor (Batzer A.G et al.,1994; Olayioye M.A.et al., 2000). En la Figura R1A es pot observar com la fosforilació d'aquesta tirosina es bloquejava tant amb cetuximab com amb gefitinib, mentre no variaven els nivells d'expressió d'ErbB1 total. A més a més, en la quantificació densitomètrica dels nivells de receptor fosforilat respecte els nivells de receptor total

(Figura R1B) vam observar com el bloqueig de cetuximab era d'un 52% i que amb gefitinib era de fins un 79%, essent aquest últim de significança estadística.

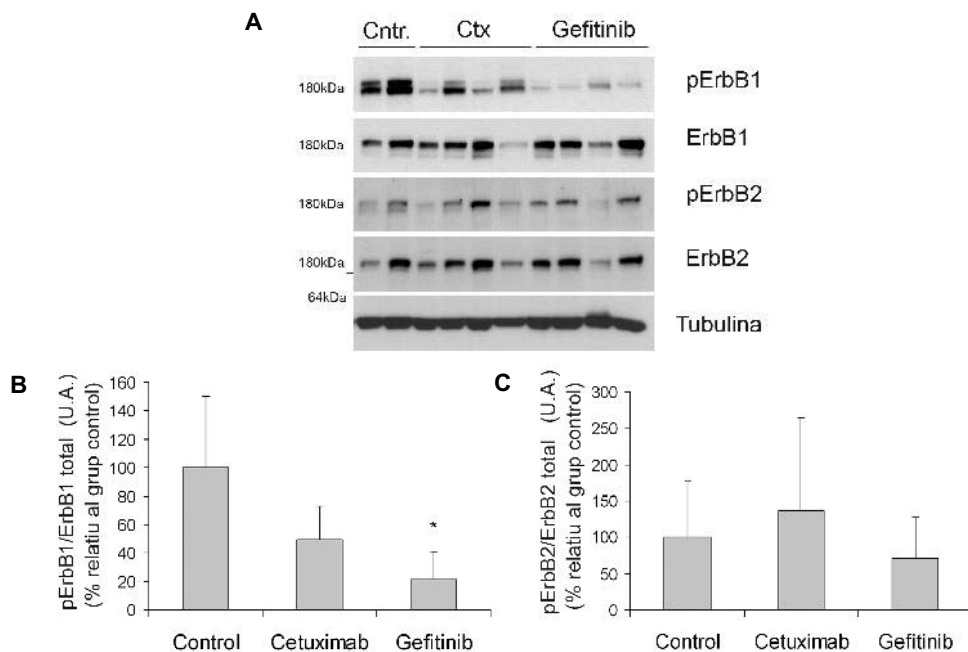


Figura R1. L'activitat d'ErbB2 és independent a la inhibició de l'activitat d'ErbB1. A) Imatge representativa dels anàlisis realitzats per *western blot* dels nivells de pErbB1, ErbB1, pErbB2, ErbB2 i la tubulina com a control de càrrega, en tumors independents del grup control, tractats amb cetuximab o amb gefitinib. Es van realitzar quantificacions densitomètriques d'aquests anàlisis per *western blot* de B) els nivells de pErbB1 respecte ErbB1 total i C) pErbB2 respecte ErbB2 total. Es mostra la mitjana relativa al grup control \pm la desviació estàndard (DE), amb unitat arbitràries (U.A.), de 4 tumors control, 4 tumors tractats amb cetuximab i 5 tumors tractats amb gefitinib. * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann-Withney.

Amb la unió del lligand els receptors ErbBs dimeritzen permetent una fosforilació i activació creuada (Hynes and Lane, 2005). Aquestes dimeritzacions poden ser homo o heterodimeritzacions, i essent ErbB2 un dels receptors més freqüents en aquestes heterodimeritzacions, vam voler analitzar també els seus nivells d'activació en presència dels dos inhibidors. En la Figura R1A es mostra una imatge representativa de l'anàlisi per *western blot* dels nivells de pErbB2 i de ErbB2 total en mostres de tumors controls i tractats amb els inhibidors d'ErbB1 (Figura R1A). Tant en la imatge mostrada en la Figura R1A com en la quantificació densitomètrica de totes les mostres analitzades relativitzant els nivells de pErbB2 i ErbB2 total (Figura R1C), s'observava que els nivells d'activació d'ErbB2 no s'alteraven en els tumors tractats amb cetuximab, o gefitinib respecte els tumors del grup control.

A continuació vam voler estudiar si les vies de senyalització per sota dels receptors ErbBs es veien afectades per la inhibició d'ErbB1. Els receptors ErbBs actius tenen la capacitat d'estimular diverses vies de senyalització intracel·lulars. Les tres més rellevants són PI3K-AKT i la via de MAPK-ERKs, i STAT3 (Hynes and MacDonald, 2009). És per això que vam estudiar els nivells d'activació d'AKT, ERK1/2 i STAT3 en les mateixes mostres tumorals on vam analitzar els nivells d'activació dels receptors ErbB1 i ErbB2 (Figura R1). A l'analitzar per *western blot* els nivells fosforilats i totals d'AKT, ERK1/2 i STAT3, i amb una posterior quantificació densitomètrica d'aquests anàlisis, no vam observar cap diferència en els nivells d'activació de cap de les vies entre els tractaments

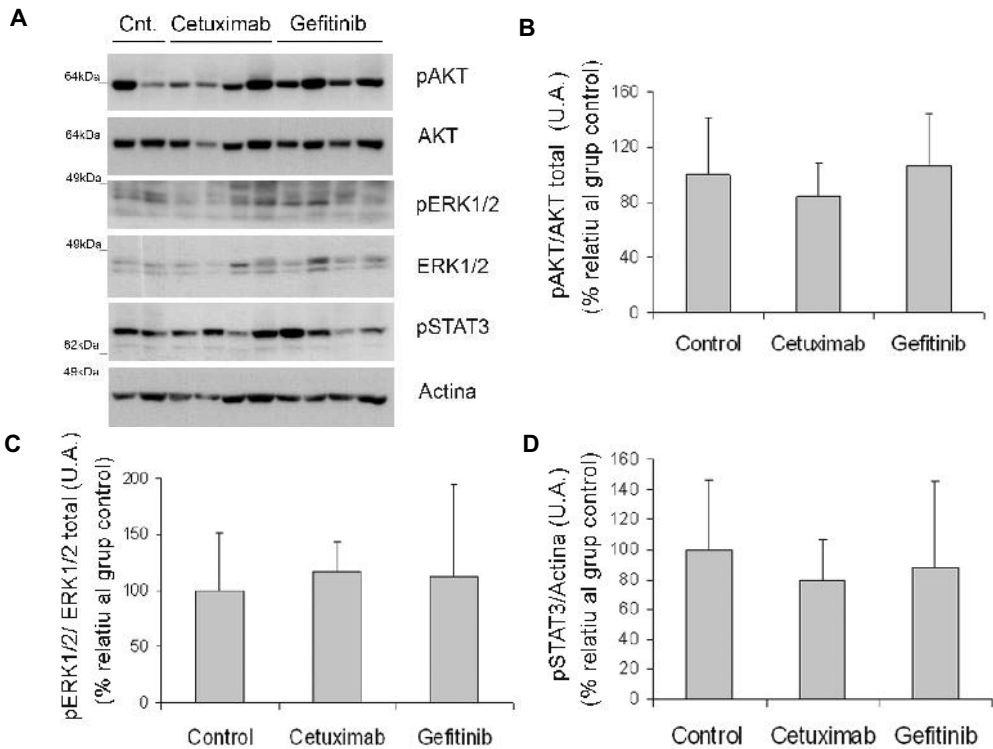


Figura R2. Els tractaments amb cetuximab o gefitinib no alteren els nivells d'activitat d'AKT, ERK1/2 o STAT3. A) Imatge representativa dels anàlisis realitzats per *western blot* dels nivells de pAKT, AKT total, pERK1/2, ERK1/2 total, pSTAT3 i la tubulina com a control de càrrega, en tumors independents del grup control, tractats amb cetuximab o amb gefitinib. Per analitzar els nivells d'activació d'aquestes vies proliferatives es van realitzar quantificacions densitomètriques dels anàlisis per *western blot* B) dels nivells de pAKT respecte AKT total, C) pERK1/2 respecte ERK1/2 total i D) pSTAT3 respecte la tubulina. Es mostra la mitjana relativa al grup control \pm DE, amb unitat arbitràries (U.A.), de 4 tumors control, 4 tumors tractats amb cetuximab i 5 tumors tractats amb gefitinib. B) Els nivells d'activació d'AKT són amb cetuximab d'un 84% i amb gefitinib d'un 106%; C) els nivells d'activació d'ERK1/2 són del 117% en els tumors tractats amb cetuximab i del 112,5% amb gefitinib; D) i els nivells de STAT3 en els tumors tractats amb cetuximab són del 79% i amb gefitinib del 88%.

amb cetuximab o gefitinib i el grup control. Aquest fet es correlacionava amb la manca d'inhibició de creixement tumoral dels tractaments amb cetuximab o gefitinib (Figura R2).

1.1.2 Lapatinib, inhibidor dual d'ErbB1 i ErbB2, bloqueja el creixement tumoral de TGT38

Malgrat que la inhibició d'ErbB1 provoca també el bloqueig de l'activitat d'ErbB2 en molts models tumorals (Lenferink et al., 2000; Moasser et al., 2001; Moulder et al., 2001), els nostres resultats mostraven una activitat d'ErbB2 i de les tres vies de senyalització analitzades independent d'ErbB1. Per comprovar si ErbB2 podia tenir un paper actiu en el creixement tumoral de TGT38 vam realitzar un experiment *in vivo* amb lapatinib, un inhibidor dual d'ErbB1 i ErbB2.

El tumor es va implantar en ratolins atímics, tal i com s'explica en l'apartat 1.1 de materials i mètodes, i en el moment de començar el tractament van ser repartits aleatòriament en dos grups. Set animals van ser tractats amb administració oral i diària de 100 mg/kg de lapatinib, i nou animals més, com a grup control, van ser tractats amb la solució vehicle de lapatinib seguint el mateix esquema d'administració. Al final del tractament vam mesurar el volums de cada un dels tumors, representats en la Figura R3, on es pot observar com el tractament amb lapatinib va inhibir el creixement tumoral de manera significativa en un 48%.

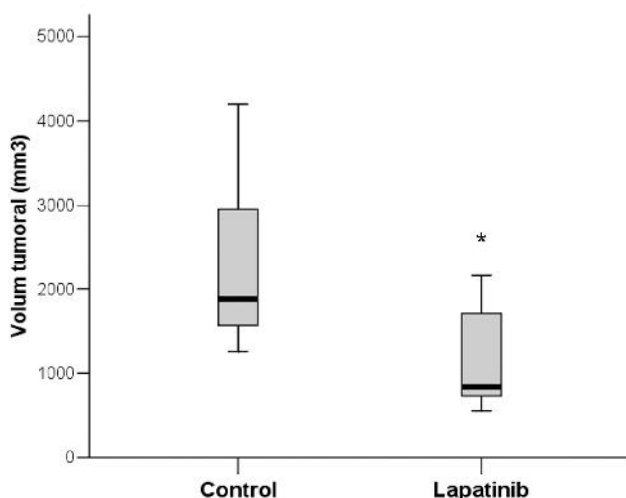


Figura R3. Lapatinib bloqueja el creixement tumoral del TGT38. El coriocarcinoma TGT38 es va implantar en ratolins atímics. Set es van tractar amb lapatinib 100 mg/kg i nou amb la solució vehicle, ambdós tractament van ser d'administració oral diària durant 13 dies. L'administració de lapatinib provoca una inhibició del creixement tumoral del 48%. Els resultats són representats mitjançant un diagrama de caixes, *boxplot*. Les medianes per al grup control i el grup lapatinib són de 1881 mm³ i de 838 mm³ respectivament. * p<0,05 en un test de la U de Mann-Withney.

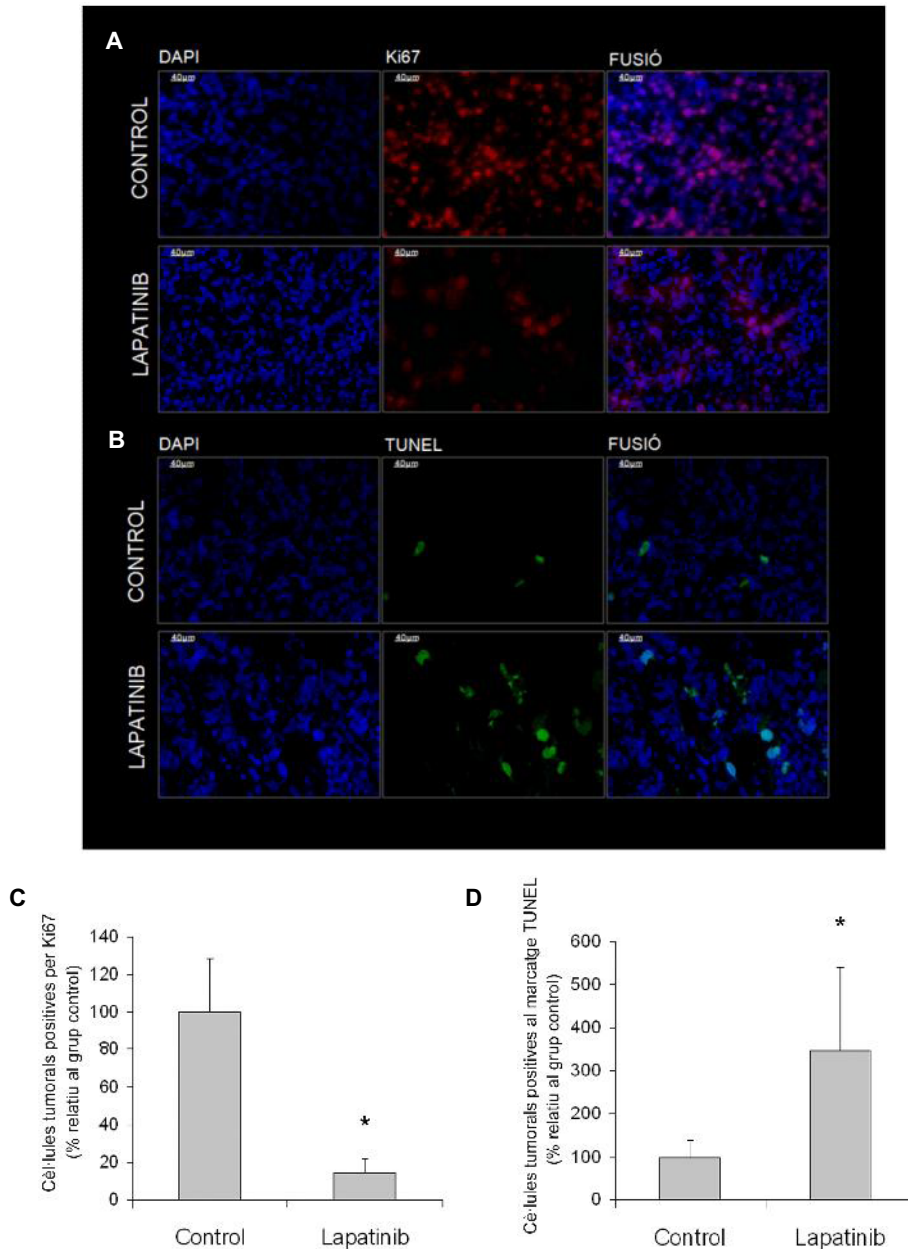


Figura R4. Lapatinib te un efecte antiproliferatiu i proapoptòtic en les cèl·lules tumorals. Immunofluorescència del marcador de proliferació Ki67 (A), el marcador apoptòtic TUNEL (B) i el marcador nuclear DAPI en seccions del TGT38 control o tractat amb lapatinib.400x, escala 40 µM. C) Quantificació dels núclis positius per a Ki67, on amb el tractament de lapatinib es redueix un 85,5% de les cèl·lules, D) i per a TUNEL, on el tractament fa augmentar fins a un 347% de cèl·lules positives. En ambdues quantificacions es representa la mitjana ± DE, % respecte el grup control. * p<0,05. en un test de la U de Mann-Withney.

Per determinar en més detall l'efecte de lapatinib en la biologia tumoral, vam voler estudiar si el tractament afectava a la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules tumorals. Amb tècniques d'immunofluorescència en mostres congelades de teixits tumorals d'ambdós tractaments, vam analitzar l'expressió de Ki67, un marcador de proliferació cel·lular, i el marcatge de TUNEL, un assaig per detectar apoptosi. Els resultats obtinguts mostraven com el tractament amb lapatinib induïa una disminució de les cèl·lules tumorals proliferatives i un augment de les cèl·lules tumorals en apoptosi, canvis en ambdós casos estadísticament significatius (Figura R4).

Una altra característica dels tumors que vam voler analitzar comparant els dos tractaments era la necrosi tumoral. Vam quantificar les àrees necròtiques de les imatges obtingudes de tenyir amb hematoxilina-eosina talls de tumors d'ambdós grups. Els tumors controls presentaven un 28% de l'àrea total necròtica, mentre que els tumors tractats amb lapatinib l'àrea necròtica augmentava fins a un 43% de l'àrea total. Tot i observar aquest augment en l'àrea necròtica en els tumors tractats, aquesta diferència no era estadísticament significativa (Figura R5).

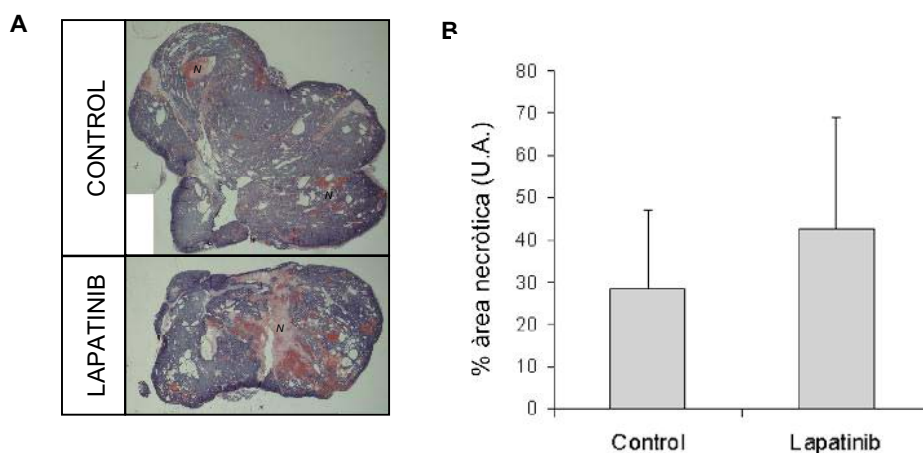


Figura R5. El tractament amb lapatinib augmenta la necrosi tumoral. A) Imatges representatives de l'anàlisi histològic per tinció d'hematoxilina-eosina dels tumors controls i tractats amb lapatinib. Amb una *N* s'han indicat àrees necròtiques com a exemples per facilitar l'observació. (4x) B) Quantificació de les àrees necròtiques respecte l'àrea total de nou tumors controls i set tumors tractats amb lapatinib. Es representa la mitjana \pm DE de les quantificacions amb unitat arbitràries (U.A.).

Per tal d'aprofundir en els mecanismes moleculars del tractament vam analitzar els nivells d'activació dels receptors ErbB1 i ErbB2, així com les vies de senyalització proliferatives ja estudiades en els tractaments anteriors amb cetuximab i gefitinib.

Així doncs, de la mateixa manera que amb els tractaments dels inhibidors purs d'ErbB1, vam analitzar per *western blot* els nivells d'expressió de les formes fosforilades i totals d'ErbB1 i ErbB2, en mostres de tumors controls i tractats amb lapatinib. Tal i com s'esperava, ja que els dos receptors són diana de l'inhibidor, lapatinib bloquejava l'activació d'ErbB1 i ErbB2. La Figura R6A mostra una imatge representativa dels anàlisis realitzats per *western blot*, on es pot observar una clara disminució dels nivells

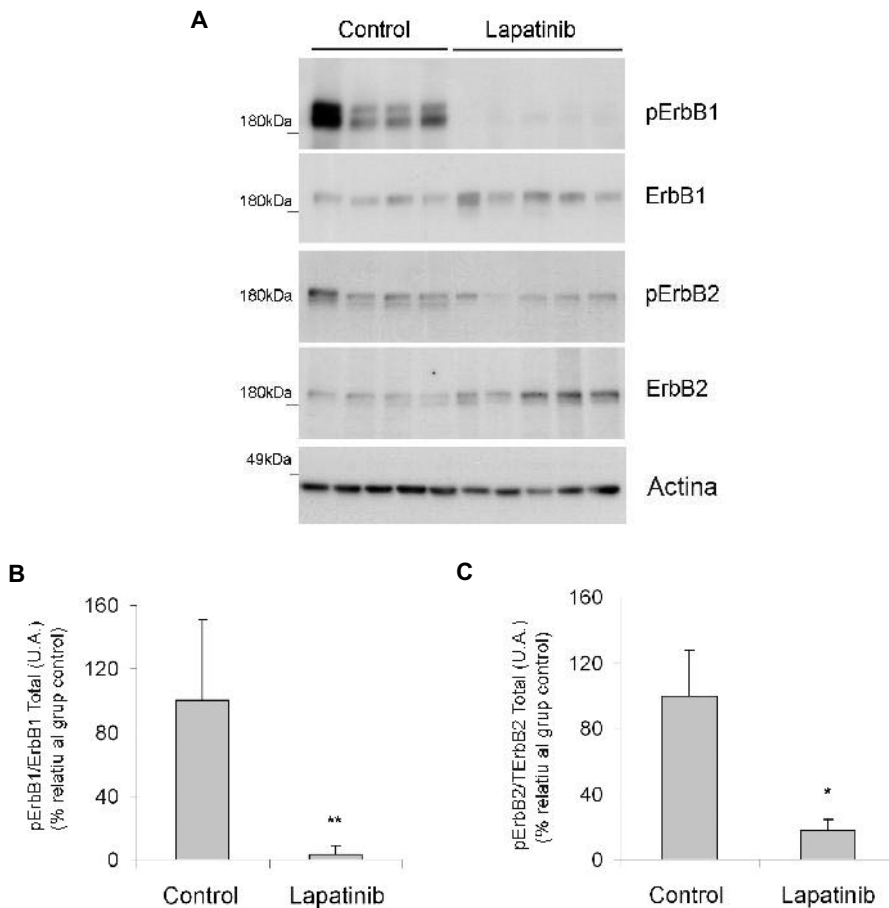


Figura R6. Lapatinib bloqueja l'activitat d'ErbB1 i ErbB2. A) Imatge representativa de l'anàlisi per *western blot* dels nivells d'expressió de pErbB1, ErbB1, pErbB2, ErbB2 i actina com a control de càrrega en tumors control i tractats amb lapatinib. B) Quantificació densitomètrica dels nivells d'expressió entre pErbB1 i ErbB1, i C) entre pErbB2 i ErbB2 de 4 mostres control i 6 mostres lapatinib, mostrades com la mitjana \pm DE, amb unitat arbitràries (U.A.). Lapatinib redueix l'activitat d'ErbB1 i ErbB2 un 95% i un 80% respectivament. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en un test de la U de Mann-Whitney.

tant de pErbB1 com de pErbB2 amb el tractament amb lapatinib respecte tumors control. Posteriorment es van fer quantificacions densitomètriques dels anàlisis per *western blot*, per a poder analitzar els nivells d'activació dels receptors relativitzant la forma fosforilada amb la total. Els resultats van confirmar que lapatinib bloquejava l'activació d'ErbB1 en un 95% i l'activació d'ErbB2 en un 80% (Figura R6 B i C).

Vam estudiar també els nivells d'activació d'AKT, ERK1/2 i STAT3 en les mateixes mostres de lisats tumorals control i tractats amb lapatinib. Com en l'anàlisi anterior es van avaluar per *western blot* amb una posterior quantificació densitomètrica els nivells de pAKT respecte AKT total, pERK1/2 respecte ERK1/2 total i pSTAT3 respecte l'actina (Figura R7 B, C, i D). Els resultats obtinguts mostraven com el tractament amb lapatinib bloquejava les tres vies estudiades un 50%, un 62% i un 52% d'inhibició respectivament.

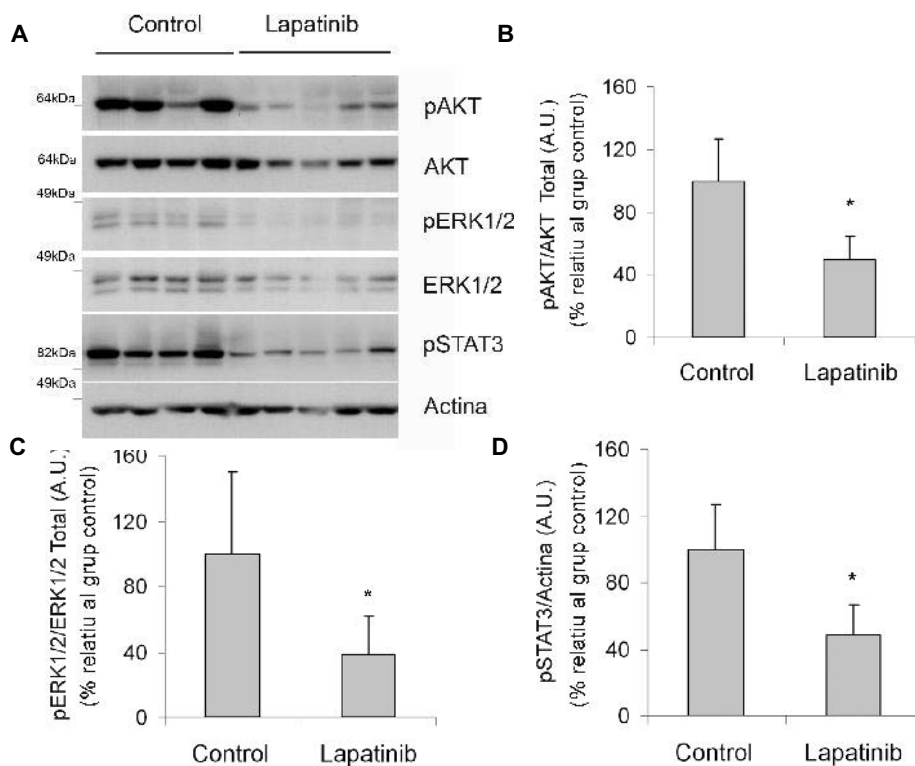


Figura R7. Lapatinib bloqueja l'activitat d'AKT, ERK1/2 i STAT3. A) Imatge representativa de l'anàlisi per *western blot* de pAKT, AKT, pERK1/2, ERK1/2, pSTAT3 i Actina en tumors control i tractats amb lapatinib. Es mostren també les quantificacions densitomètriques dels anàlisis per *western blot* fets en 4 tumors control i 6 tumors lapatinib B) dels nivells de pAKT respecte AKT total, C) pERK1/2 respecte ERK total i D) pSTAT3 respecte la tubulina. Es mostra la mitjana relativa al grup control \pm DE, amb unitat arbitràries (U.A.). Lapatinib bloqueja l'activitat analitzada en un B) 50%, C) 62% i D) 52% * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann-Whitney.

Corresponent així el bloqueig de les vies de senyalització proliferatives amb la disminució de la proliferació de les cèl·lules tumorals (Figura R4C) i amb la inhibició del creixement en volum tumoral (Figura R3).

Els resultats descrits fins al moment mostraven que mentre el bloqueig pur d'ErbB1 no afectava el creixement tumoral ni a l'activitat d'ErbB2, quan aquest receptor s'inhibia de manera addicional a ErbB1 es bloquejava el creixement tumoral.

1.1.3 Formació de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 en el TGT38

ErbB2 és un receptor que manca de capacitat d'unió a lligand, i que per senyalitzar requereix de la formació d'heterodimers amb els altres receptors de la família, exceptuant algunes situacions de sobreexpressió, com en alguns càncers de mama (Hynes and Lane, 2005). Donat que els nostres resultats mostraven una activitat d'ErbB2 independent d'ErbB1, vam considerar la involucració d'algun altre dels receptors de la família en la senyalització proliferativa junt amb ErbB2. Es per això que vam analitzar l'expressió dels quatre receptors de la família d'ErbBs en el nostre model tumoral.

Per començar vam avaluar els nivells d'expressió dels mRNAs d'ErbB1, ErbB2, ErbB3 i ErbB4 amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR), en mostres de tumors TGT38 comparant-les amb mostres de testicle humà com a control d'expressió no tumoral.

Els resultats de la RT-PCR, mostrats en la Figura R8A, indicaven que ErbB1 i ErbB2 s'expressaven tres vegades més que en el testicle normal, però el que ens cridà més l'atenció va ser la sobreexpressió d'ErbB3, que era de 16 vegades més. Per altra banda cal afegir que els nivells d'mRNA d'ErbB4 eren molt inferiors als expressats en testicle normal humà.

Aquests resultats obtinguts per RT-PCR van ser validats a nivell de proteïna analitzant els nivells d'expressió proteica d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3 en mostres de TGT38 i mostres de testicle humà. En la Figura R8B els tres primers carrils corresponen a tres mostres independents de testicle humà, i tot i que es va obtenir poca expressió dels receptors en algunes d'elles, es podia observar clarament com els nivells d'expressió en el TGT38 eren molt superiors.

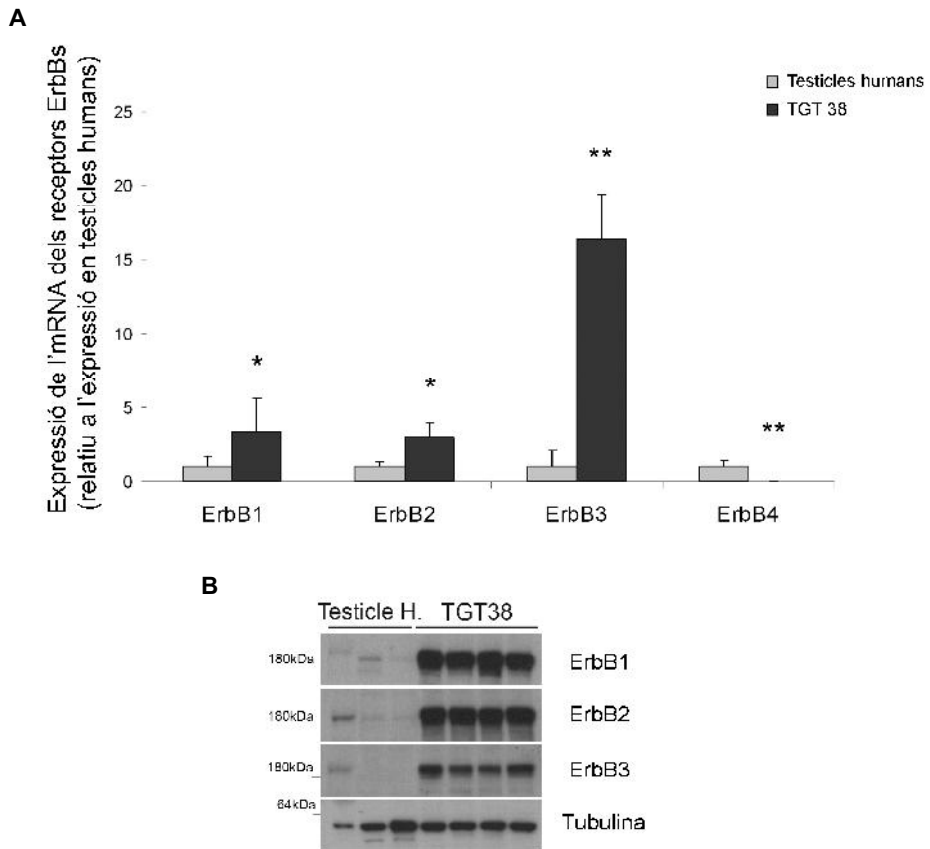


Figura R8. ErbB1, ErbB2 i ErbB3 presenten elevats nivells d'expressió en el TGT38. A) Els nivells d'mRNA d'ErbB1, ErbB2, ErbB3 i ErbB4 humans van ser analitzats per RT-PCR. Resultats expressats com la mitjana \pm DE dels nivells d'expressió dels mRNA en set tumors TGT38 relatius als nivells d'expressió dels mRNAs en quatre mostres de testicle humà. B) Imatge de *western blot* dels nivells d'expressió proteica d'ErbB1, ErbB2, ErbB3 i la tubulina, com a control de càrrega, en tres mostres independents de testicle humà, i quatre mostres independents de TGT38. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, en un test de la U de Mann-Whitney.

Donada l'elevada expressió d'ErbB3 en aquest model, i la molt baixa expressió d'ErbB4, era congruent estudiar la possibilitat de senyalització proliferativa d'ErbB2 juntament amb ErbB3. La presència de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 ja ha estat descrita extensament en diferents tumors, i és considerat el dímer ErbB més potent pel que fa la força d'interacció i la senyalització intracel·lular (Baselga and Swain, 2009).

Així doncs vam voler analitzar la presència de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 en el nostre model tumoral, el TGT38. Per fer-ho vam immunoprecipitar ErbB1 i ErbB2 en mostres de lisats tumorals de TGT38, i posteriorment vam identificar per *western blot* la presència dels diferents membres de la família d'ErbBs en aquests immunoprecipitats. Es van observar nivells molt baixos d'ErbB2 i ErbB3 en l'immunoprecipitat (IP) d'ErbB1 (Figura R9A tercer carril) indicant molt poca formació de dímers ErbB1 amb els altres dos receptors. Per altra banda, en l'IP d'ErbB2 (Figura R9B tercer carril) es van observar nivells molt baixos d'ErbB1 però nivells més elevats d'ErbB3, confirmant la poca dimerització d'ErbB2 amb ErbB1 i demostrant la presència de dímers ErbB2/ErbB3. Cal afegir que els nivells elevats d'ErbB1 en l'IP ErbB1 i d'ErbB2 en l'IP ErbB2, juntament amb la nitidesa del control negatiu, validen la tècnica emprada.

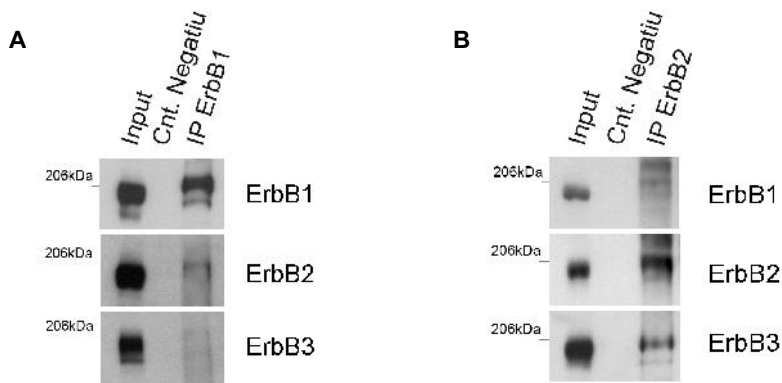


Figura R9. Formació de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 en el TGT38. A) Immunoprecipitació d'ErbB1 i B) d'ErbB2 en lisats proteics de TGT38. Es mostren les imatges obtingudes per *western blot* de la detecció de l'expressió d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3 en els inputs (5% del lisat total immunoprecipitat), el control negatiu (mostres sense anticòs conjugat) i en cada immunoprecipitat (IP).

Els resultats obtinguts suggerien que en el nostre model tumoral existia una formació preferencial dels heterodímers ErbB2/ErbB3 davant la formació de dímers amb ErbB1. En aquest punt calia confirmar que l'heterodímer ErbB2/ErbB3 era actiu i tenia capacitat de senyalització. Per això havíem d'analitzar l'activitat d'ErbB3 en els tumors dels diferents tractaments, quan s'inhibia ErbB1 per una banda i quan s'inhibien ErbB1 i ErbB2 per l'altre.

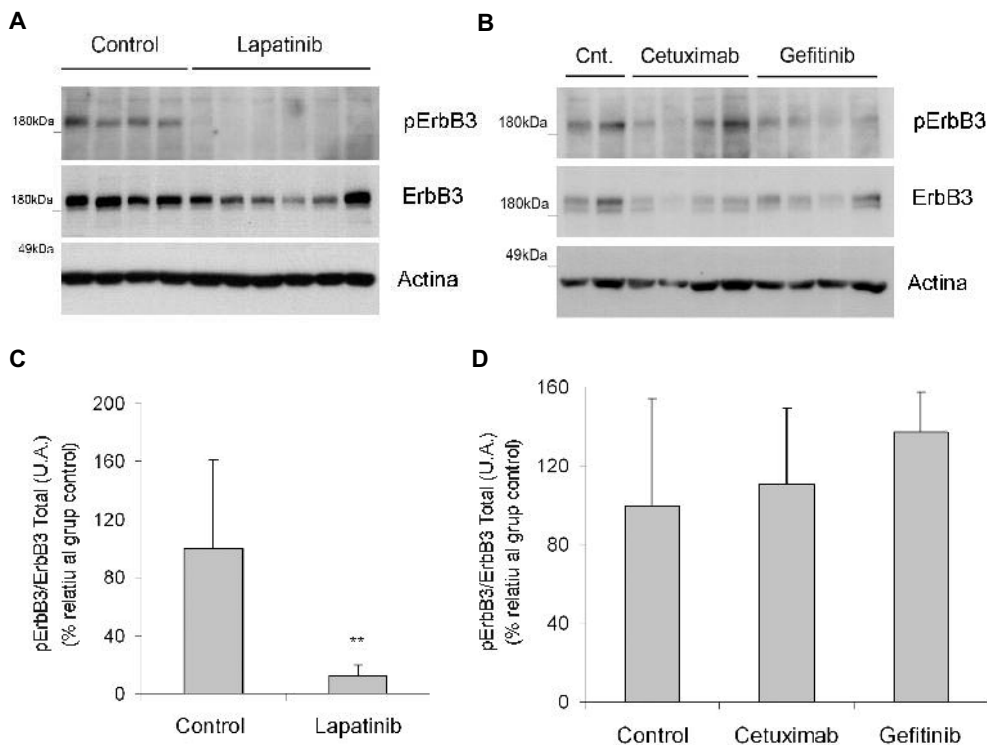


Figura R10. L'activitat d'ErbB3 es bloqueja amb el tractament amb lapatinib, però no s'altera amb els tractaments que inhibeixen només ErbB1. A i B) Imatges representatives dels anàlisis realitzats per *western blot* dels nivells d'expressió de pErbB3, ErbB3 total, i l'actina, com a control de càrrega, en els tumors controls respectius, i els tumors tractats amb lapatinib (A), o amb cetuximab i gefitinib (B). Una posterior quantificació densitomètrica ens permet mesurar els nivells d'activació d'ErbB3; C) que en el tractament amb lapatinib es redueix un 52%; D) i en els tractaments amb cetuximab i gefitinib fins i tot augmenta un 10% i un 36%, cap dels dos canvis significatiu. Els resultats són mostrats com a les mitjanes, amb unitats arbitràries (U.A.) \pm DE relatives al grup control corresponent. C) S'han quantificat 4 mostres de tumors control i sis de tractats amb lapatinib. D) De cada tractament s'han quantificat quatre mostres. ** $p < 0,01$ en un test de la U de Mann-Whitney.

Tal i com es pot observar en la Figura R10A, en els anàlisis per *western blot* es va observar clarament la inhibició de la fosforilació d'ErbB3 en el tractament amb lapatinib, mentre que els nivells de receptor total no variaven de manera significativa. Per altra banda, quan vam analitzar les mostres dels tumors tractats amb cetuximab o gefitinib vam observar que els nivells d'activació d'ErbB3 no variaven amb cap dels dos tractaments (Figura R10B i D).

Així doncs els resultats obtinguts mostraven una activitat d'ErbB3 dependent d'ErbB2; l'activitat d'ErbB3 es bloquejava quan l'activitat d'ErbB2 es veia compromesa amb

lapatinib, mentre que amb els inhibidors purs d'ErbB1 l'activitat d'ErbB3 no s'alterava. Quedava confirmat doncs que l'heterodímer ErbB2/ErbB3 era actiu en el TGT38.

A continuació vam trobar interessant estudiar la localització d'ErbB1 i ErbB2 en els talls tumorals del TGT38 per comprovar que si no interaccionaven no era per impediments estèrics de no expressar-se en les mateixes cèl·lules. Amb aquest propòsit vam realitzar una co-immunofluorescència dels dos receptors en diferents talls de tumor TGT38. En la Figura R11 es pot observar com ErbB1 i ErbB2 colocalitzaven en les membranes de les cèl·lules tumorals del TGT38.

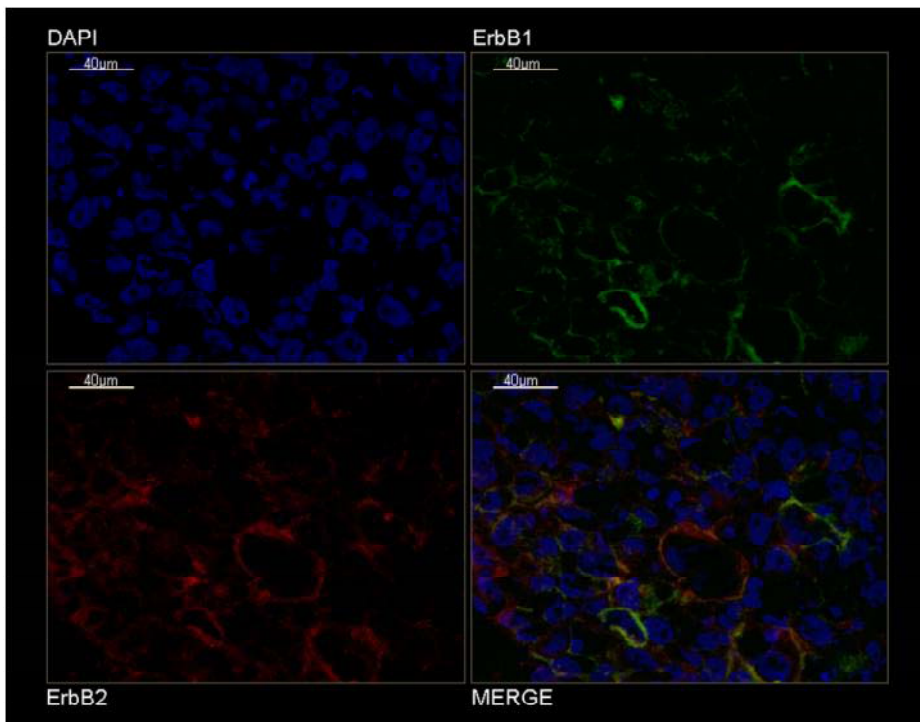


Figura R11. ErbB1 i ErbB2 co-localitzen en les cèl·lules tumorals del TGT38. Doble marcatge de ErbB1 en verd i ErbB2 en vermell en seccions d'OCT del TGT38. En blau estan tenyits els nuclis amb dapi. En el merge, la combinació de les tres imatges, es pot observar com ErbB1 i ErbB2 co-localitzen en les membranes de les mateixes cèl·lules tumorals.

1.1.4 Expressió d'ErbB3 en TGTs

Els resultats obtinguts fins el moment indicaven que ErbB2 dimeritzava amb ErbB3 i de manera preferencial davant ErbB1 en el TGT38.

La següent qüestió que se'ns plantejava era si aquest fet podia ser general de tumors testiculars o exclusiu del model utilitzat. Per això vam voler analitzar l'expressió dels receptors ErbBs en diversos tumors testiculars ortotòpics de diferents tipologies histològiques. En la imatge de la Figura R12 es pot observar com ErbB3 s'expressava en tots els tumors analitzats seguint un patró molt semblant a l'expressió d'ErbB2. Els nivells d'ambdós receptors eren molt més elevats en els tumors ortotòpics que en la mostra de testicle humà. Els tumors que presentaven més expressió d'aquests receptors eren els coriocarinomes i els tumors de components heterogenis. Aquests dos grups de tumors eren on ErbB1 es trobava expressat en majors nivells. Per altra banda els nivells d'ErbB1 respecte el testicle humà eren molt més elevats però no en uns nivells tant destacats com en ErbB2 i ErbB3. Per altra banda ErbB4 es trobava expressat en poques mostres tumorals i en nivells semblants o inferiors als nivells d'expressió en el testicle humà. Cal afegir també que en aquesta imatge hi ha inclosa una mostra tumoral del model utilitzat anteriorment, el coriocarcinoma TGT38.

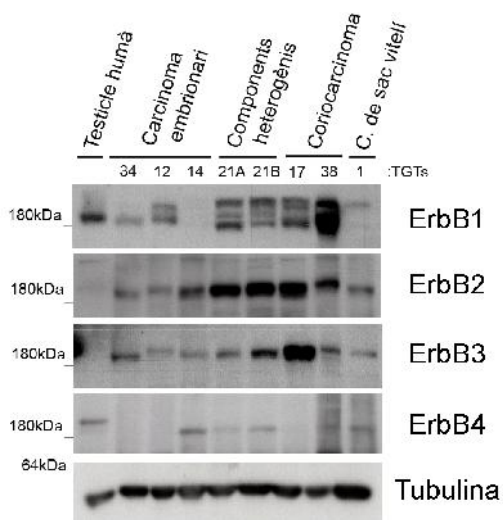


Figura R12. ErbB1, ErbB2 i ErbB3 s'expressen en diferents tumors testiculars ortotòpics. Imatge de l'anàlisi per *western blot* dels nivells d'expressió de ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 i la tubulina, com a control de càrrega, en una mostra de testicle humà i en tumors testiculars ortotòpics de diferent tipologia histològica: carcinoma embrionari, components heterogenis, coriocarcinoma i carcinoma de sac vitellí.

Havíem comprovat que ErbB1, ErbB2 i ErbB3 s'expressaven en pràcticament tots els tumors testiculars ortotòpics analitzats. En aquest punt vam voler analitzar l'expressió d'aquests tres receptors també en els tumors originaris dels pacients humans. En

col·laboració amb els departaments d'anatomia patològica de l'Hospital de Bellvitge i de l'Hospital de la Vall d'Hebrón vam realitzar la detecció per IHQ d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3, així com una caracterització amb hematoxilina eosina, de tres tumors diferents comparant el tumor original de pacient humà amb el seu corresponent tumor implantat ortotòpicament en ratolí. Vam analitzar un tumor de carcinoma embrionari, un carcinoma de sac vitel·lí i un coriocarcinoma. Els resultats ens van mostrar que tots els tumors primaris, independentment del component histològic, expressaven els tres receptors i els patrons d'expressió es mantien en els seus respectius tumors ortotòpics (Figura R13). Així doncs podíem confirmar que els receptors ErbBs s'expressaven en diferents tumors TGTs, i que els models ortotòpics utilitzats reproduïen aquesta expressió.

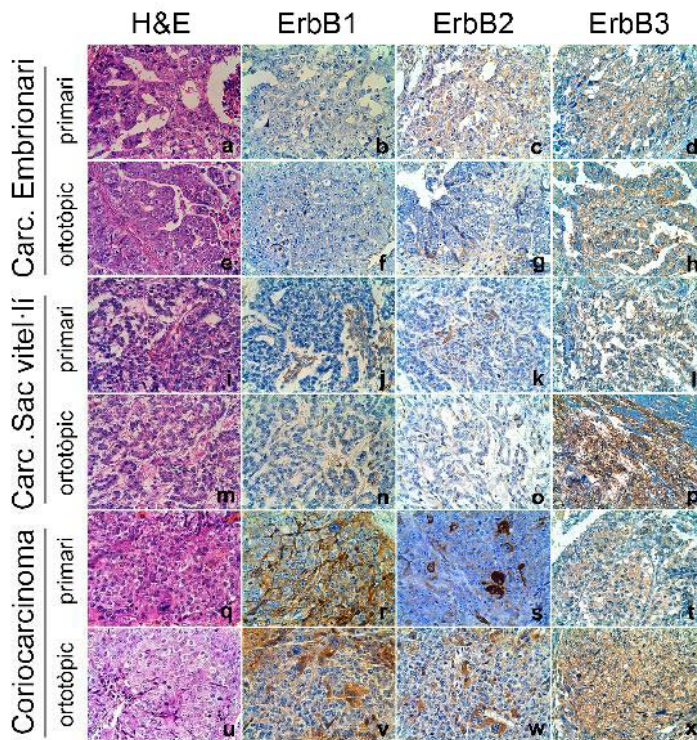


Figura R13. El patró d'expressió d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3 es manté dels tumors humans originaris als models ortotòpics. Caracterització histològica i immunohistoquímica dels tumors primaris humans i els seus respectius tumors xenògrafs implantats ortotòpicament en ratolins atímics: (TGT:TGT12 per a el carcinoma embrionari; TGT1 per a el carcinoma de sac vitel·lí, i TGT38 pel coriocarcinoma): (a,e,i,m,q i u) tinció d'hematoxilina-eosina; (b, f, j, n, r i v) immunotinció per a ErbB1; (c, g, k, o, s i w) immunotinció per a ErbB2; (d, h, l, p, t i x) immunotinció per a ErbB3. (400X)

1.2 Avaluació de l'efecte *in vitro* de les teràpies dirigides a receptors ErbBs en línies de cèl·lules de TGTs

Per continuar estudiant l'efecte de les teràpies dirigides a receptors ErbBs i testar-les en models de TGTs de diferents components histològics, vam utilitzar quatre línies cel·lulars *in vitro*.

1.2.1 Efecte de gefitinib i lapatinib en la proliferació de línies cel·lulars de tumor testicular

En primer lloc vam avaluar l'efecte de la inhibició d'ErbB1, amb gefitinib, i la inhibició dual d'ErbB1 i ErbB2, amb lapatinib, en la proliferació de vèries línies cel·lulars de TGTs. Vam seleccionar quatre línies cel·lulars, totes originàries de TGTs no seminomatosos i de diferents característiques histològiques. Les característiques de cada una es poden consultar a la Taula R1 presentada a continuació.

Línia Cel·lular	Origen	Component histològic	Referències
833K	Metàstasi abdominal	CE, T	(Bronson et al., 1980)
1411H	Primari	CE, SV	(Vogelzang et al., 1985)
GCT27	Primari	CE	(Pera et al., 1987)
SuSa	Primari	CE, T	(Hogan et al., 1977)

Taula R1. Taula resum de la informació de les línies cel·lulars estudiades. Adaptació de Fung et al., 2006 (Fung et al., 2006).CE=Carcinoma Embrionari; T=Teratoma; SV=Tumor de Sac Vitel·li.; NSGCT=Tumor de cèl·lula germinal no-seminomatós.

Per estudiar com afectaven els tractaments amb gefitinib i lapatinib en la viabilitat d'aquestes línies cel·lulars, vam realitzar assajos MTT, una tècnica que mesura l'activitat metabòlica de les cèl·lules (Berridge et al., 2005) i que podem relacionar amb viabilitat cel·lular. En la Figura R14 es poden observar les corbes de viabilitat cel·lular amb diferents dosis de lapatinib i gefitinib de 0 a 10 μ M en les cèl·lules GCT27, les 1411H i les SuSa. En les 833K es pot observar la corba de dosi resposta de lapatinib.

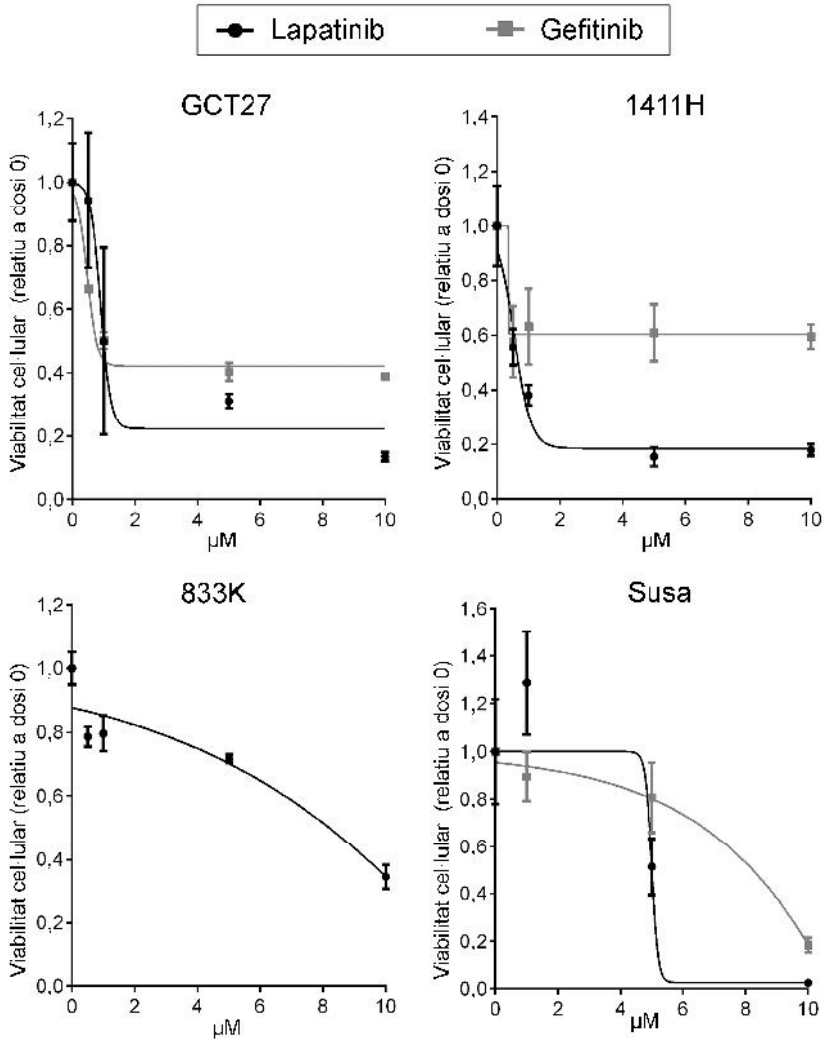


Figura R14. Lapatinib bloqueja la viabilitat cel·lular *in vitro* de quatre línies cel·lulars de tumors testiculars. Corbes d'activitat MTT en resposta a tractaments de 4 dies de 0-10 μM de lapatinib i gefitinib en les línies cel·lulars GCT27, 1411H i SuSa; i corba de lapatinib en les 833K. Es troben representades les mitjanes de 4 mesures (amb unitats arbitràries) per cada punt de les corbes \pm DE, relativitat respecte la dosi 0 on només s'hi ha afegit DMSO.

Lapatinib induïa el bloqueig de la viabilitat cel·lular en les quatre línies de tumors testiculars estudiades, assolint en tres d'elles, les GCT27, les 1411H i les SuSa, una inhibició de més del 70% en dosis inferiors a 10 μM . En aquestes tres línies cel·lulars es va estudiar també l'efecte de gefitinib i es va observar que encara que també bloquejava la viabilitat cel·lular ho feia en menor mesura que lapatinib (Figura R14).

Vam voler caracteritzar els nivells d'expressió dels diferents receptors ErbBs en les quatre línies cel·lulars, per estudiar si hi podia haver alguna relació amb la sensibilitat als tractaments de lapatinib o gefitinib. Amb aquest objectiu vam realitzar un *western blot* de les quatre línies cel·lulars per als nivells d'expressió dels quatre receptors, i posteriorment vam mesurar aquests nivells d'expressió per quantificació densitomètrica normalitzant amb els nivells de tubulina corresponent per cada mostra (Figura R15).

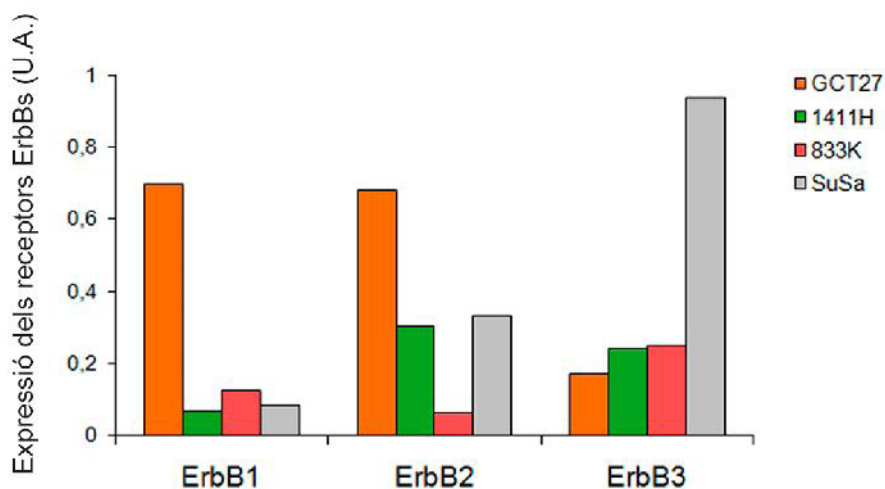


Figura R15. Expressió dels receptors ErbBs en les quatre línies cel·lulars testiculars. Mitjançant un *western blot* es van analitzar els nivells d'ErbB1, ErbB2 i ErbB3 en les GCT27, les 1411H, les 833K i les SuSa. Per quantificació densitomètrica es van mesurar els nivells d'expressió de cada receptor, normalitzats per la tubulina de la mostra corresponent. En aquesta figura mostrem els resultats obtinguts en unitats arbitràries (U.A.).

Les GCT27 eren les cèl·lules amb els nivells d'ErbB1 més elevats, mentre que en les altres tres línies els nivells eren molt més baixos. Pel que fa l'expressió d'ErbB2, eren també les GCT27 les cèl·lules que expressaven uns nivells més elevats d'aquest receptor, mentre que les 1411H i les SuSa presentaven uns nivells semblants, i essent les 833K les cèl·lules que presentaven els nivells d'ErbB2 més baixos. Els nivells d'ErbB3 eren semblants en les GCT27, les 833K i les 1411H, mentre que les SuSa presentaven uns nivells d'ErbB3 molt més elevats. Els nivells obtinguts d'ErbB4 en les quatre línies cel·lulars eren tant baixos que no els hem representat en la Figura R15.

Les línies cel·lulars més sensibles a lapatinib, GCT27, 1411H i SuSa, eren les que presentaven nivells d'ErbB2 més elevats. A més a més, en les SuSa, la línia que expressava els nivells d'ErbB3 més elevats, era on lapatinib acabava bloquejant amb més intensitat la viabilitat cel·lular. Pel que fa la resposta a gefitinib teníem que la línia

que expressava els nivells més elevats d'ErbB1, la GCT27, responia a dosis baixes de gefitinib però aquesta resposta s'aturava ràpidament i no s'obtenia una inhibició de més del 60% en les dosis més elevades. Les altres dues línies testades amb gefitinib, tot i tenir nivells d'expressió d'ErbB1 semblants tenien respostes a l'inhibidor diferents; per una banda les SuSa tenien un efecte menor a baixes dosis de gefitinib, mentre que a 10 μ M s'arribava a obtenir una inhibició de la viabilitat cel·lular del 80%. Les 1411H es comportaven de manera contrària, presentant una elevada sensibilitat a l'inhibidor a baixes dosis però sense obtenir més d'un 40% d'inhibició de la viabilitat cel·lular a dosis ja molt baixes.

Així doncs mentre que la relació entre l'expressió d'ErbB1 i la resposta a gefitinib quedava molt poc clara, l'expressió d'ErbB2 i ErbB3 en les línies cel·lular testiculars podia ser rellevant en l'efecte de lapatinib.

1.2.2 Efecte de la inhibició d'ErbB3 en la línia tumoral testicular SuSa

Amb tots els resultats obtinguts la següent qüestió que se'ns va plantejar era l'efecte que tindria la inhibició d'ErbB3 en les línies de TGTs.

Degut a la dificultat d'inhibir ErbB3 en els models *in vivo* vam optar per realitzar assajos *in vitro* amb una de les línies cel·lulars ja testades i que presentava uns nivells d'expressió d'ErbB3 elevats, les SuSa. Amb l'objectiu d'inhibir l'expressió d'ErbB3 vam transduir les cèl·lules amb constructes lentivirals, cada un expressant un shRNA específic per a *ErbB3* humà. Els constructes lentivirals utilitzats aportaven resistència a la puromicina, amb la que vam seleccionar i així vam generar tres línies cel·lulars estables: les SuSa-EV (de l'anglès *empty vector*) amb un constructe sense seqüència shRNA, i dues línies amb dos vectors lentivirals shRNA per ErbB3 independents, les SuSa-shErbB3.1 i les SuSa-shErbB3.2. En la Figura R16A es pot observar com els nivells d'ErbB3 es van inhibir en les dues línies SuSa-shErbB3s, mentre que els nivells dels altres receptors, ErbB1, ErbB2 i ErbB4, no es van veure alterats. Amb l'objectiu d'estudiar si la inhibició d'ErbB3 afectava la viabilitat de les cèl·lules, vam mesurar el seu creixement contant el nombre de cèl·lules durant set dies, havent sembrat el mateix nombre de cèl·lules inicial. Els resultats mostraven un creixement més lent de les dues línies SuSa-shErbBs respecte la SuSa-EV, essent les diferències en el seté dia estadísticament significatives (Figura R16B).

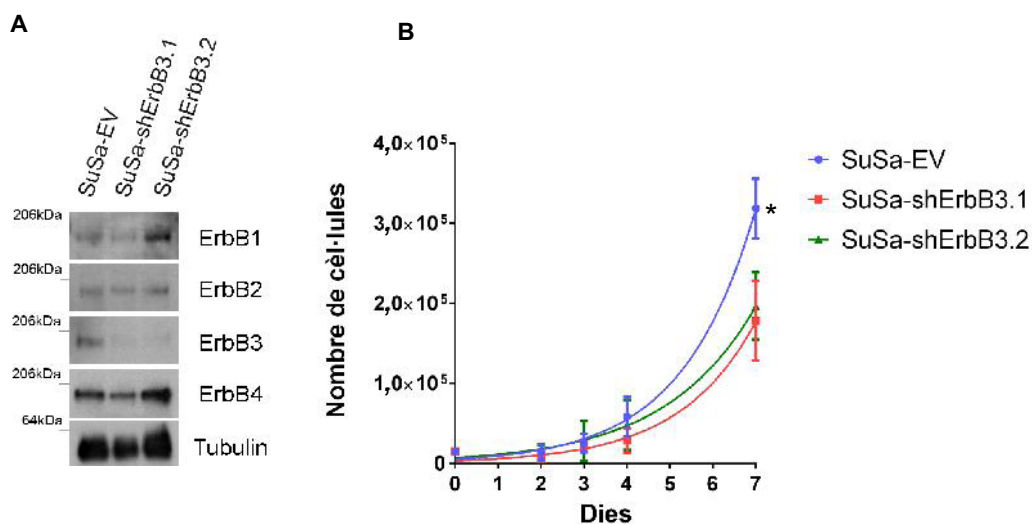


Figura R16. La inhibició d'ErbB3 frena el creixement de les cèl·lules SuSa. Es van generar tres línies cel·lulars transduint les SuSa amb vectors lentivirals de shRNA per ErbB3 basats en pLKO.1, on SuSa-EV és el control sense seqüència shRNA i les SuSa-shErbB3.1 i SuSa-shErbB3.2 eren dues línies amb dos constructes lentivirals independents. A) Anàlisi dels nivells d'expressió dels diferents receptors ErbBs en les tres línies cel·lulars. L'expressió d'ErbB3 en les SuSa-shErbB3.1 i -2 estava inhibida respecte les SuSa-EV, mentre que l'expressió dels altres receptors, ErbB1, ErbB2 i ErbB4 no variava entre les tres línies. B) Es van sembrar les tres línies en plaques de 24 pous, a 15.000 cèl·lules per pou. Es va fer un seguiment del creixement contant el número de cèl·lules en cada pou durant 7 dies. Es representa la mitjana \pm DE en cada punt. * $p \leq 0,05$ respecte les altres dues línies en el test estadístic de la U de Mann-Whitney.

Vam generar tumors inoculant les línies SuSa-EV i les SuSa-shErbB3.2 en els testicles de ratolins atímics. De cada tumor generat es van implantar fragments macroscòpicament homogenis en 5 ratolins per cada tumor. En la Figura R17 es mostren els volums tumorals d'aquests dos tumors generats, SuSa-EV i SuSa-shErbB3.2, a 38 dies d'implantació, i es pot observar com el tumors SuSa-shErbB3.2 van créixer menys que els SuSa-EV. Així doncs vam corroborar els resultats obtinguts anteriorment amb cèl·lules però *in vivo*, encara que les diferències no eren significatives.

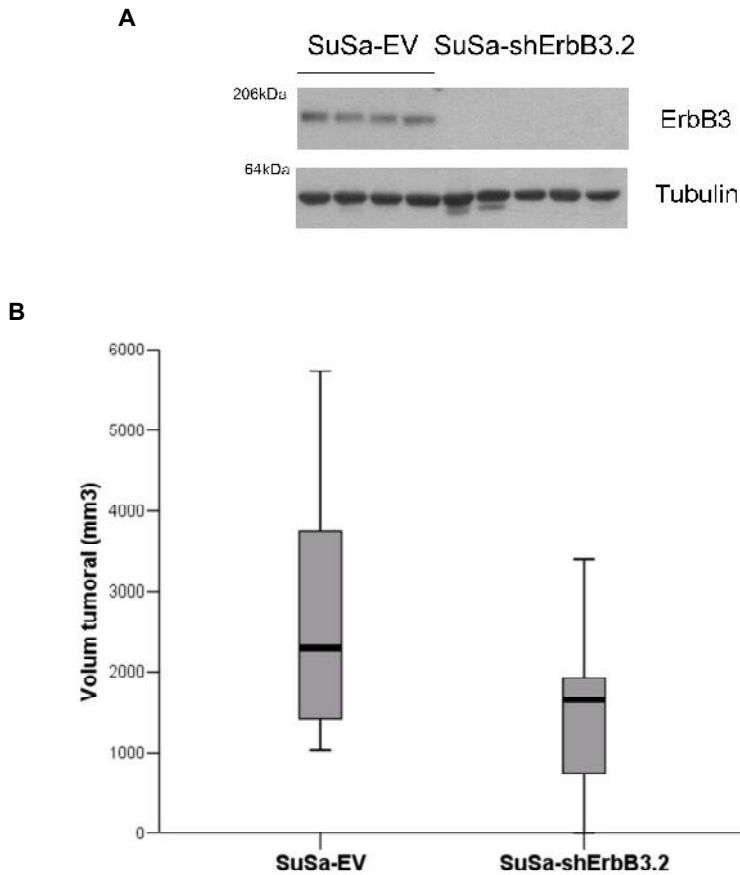


Figura R17. Els tumors generats amb les SuSa-shErbB3.2 creixen menys que els tumors originats de les SuSa-EV. Es van generar tumors ortotòpics de cèl·lules SuSa-EV i SuSa-shErbB3.2. A) Comprovació de que la línia cel·lular SuSa-shErbB3.2 manté el silenciament del gen ErbB3 mitjançant l'anàlisi per *western blot* dels nivells d'expressió d'ErbB3 en els tumors generats. B) Cada tumor es va implantar en els testicles de 5 ratolins. Es representen els volums finals en diagrama de caixes a 38 dies de la implantació.

1.2.3 Efecte de la inhibició de diferents receptors ErbBs en línies de cèl·lules tumorals testiculars

A continuació volíem avaluar l'efecte de la inhibició de diversos receptors ErbBs, de manera senzilla o combinada, en una de les línies cel·lulars de TGTs. Amb aquest propòsit doncs vam tractar les tres línies SuSa-shRNA amb els fàrmacs gefitinib i lapatinib; de manera que podíem avaluar l'efecte de la inhibició simple d'ErbB1 i d'ErbB3, i la combinació de la inhibició d'ErbB1 i ErbB2, d'ErbB1 i ErbB3, i d'ErbB1 ErbB2 i ErbB3.

Vam tractar les SuSa-EV i les dues SuSa-shErbB3s durant 4 dies amb DMSO, gefitinib 5 μ M i lapatinib 5 μ M. Finalment vam mesurar la viabilitat cel·lular en un assaig MTT. Els resultats mostrats són els obtinguts de tres experiments independents. Ja que el creixement de les SuSa-shErbB3s era diferent a les SuSa-EV vam analitzar els resultats relativitzant cada punt al seu corresponent tractament amb DMSO (Figura R18). Els resultats obtinguts mostraven com el tractament amb gefitinib de la línia SuSa-EV no era suficient per comprometre la viabilitat de les cèl·lules tumorals, mentre que el tractament amb lapatinib en aquesta línia cel·lular, tal i com s'esperava dels resultats obtinguts *in vivo*, bloquejava fins un 30% el creixement de la línia cel·lular. Per altra banda el tractament amb gefitinib de les línies amb l'expressió d'ErbB3 silenciada provocava una inhibició de la viabilitat cel·lular equiparable al tractament amb lapatinib de la línia control, la SuSa-EV. Els nostres resultats indicaven com la inhibició dual d'ErbB1 i ErbB3 tenia efecte en el creixement de les cèl·lules testiculars tumorals de manera semblant a l'efecte del bloqueig d'ErbB1 i ErbB2, amb lapatinib.

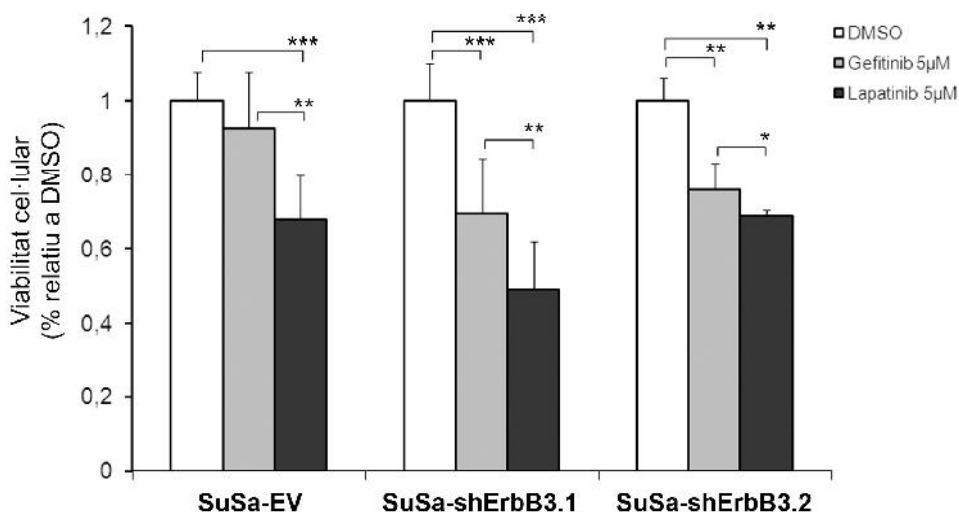


Figura R18. Lapatinib bloqueja la viabilitat cel·lular de la línia SuSa a nivells similars a la inhibició combinada d'ErbB1 i ErbB3. Les SuSa-EV i les dues SuSa-shErbB3s van ser tractades per 4 dies amb DMSO, Gefitinib 5 μ M o Lapatinib 5 μ M i es va analitzar l'activitat MTT de cada condició. Els resultats de tres experiments independents són mostrats com a percentatge de viabilitat cel·lular respecte cada punt de DMSO corresponent \pm DE, amb unitats arbitràries (U.A.) *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ en el test estadístic de la U de Mann-Withney.

Per corroborar els resultats obtinguts amb les SuSa vam realitzar la mateixa aproximació amb una de les altres línies de tumor testicular, les GCT27. Vam generar

les línies estables GCT27-EV, GCT27-shErbB3.1 i GCT27-shErbB3.2 transduïnt amb els mateixos vectors lentivirals utilitzats per generar les línies SuSa-EV i SuSa-shErbBs.

En primer lloc vam analitzar els nivells d'expressió dels quatre receptors ErbBs en les tres línies GCT27-shRNA generades. En la Figura R19A es pot observar com els nivells d'ErbB3 es veien molt disminuïts en la GCT27-shErbB3.2 respecte la GCT27-EV, mentre que els nivells d'inhibició d'expressió aconseguits en la línia GCT27-shErbB3.1 eren menors. Per altra banda els nivells d'ErbB1 no variaven en excés en les GCT27-shErbB3s.

Mitjançant assajos MTT en aquestes tres línies cel·lulars generades, vam estudiar si la inhibició d'ErbB3 afectava a la viabilitat cel·lular. Els resultats van mostrar que la inhibició d'aquest receptor produïa una disminució significativa en la viabilitat cel·lular (Figura R19B).

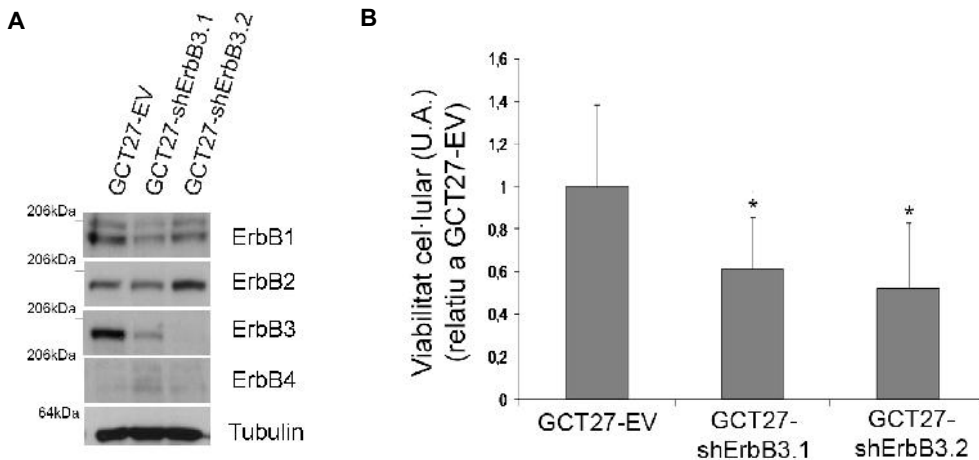


Figura R19. La inhibició d'ErbB3 redueix la viabilitat de les cèl·lules GCT27. Es van generar tres línies cel·lulars transduïnt les GCT27 amb vectors lentivirals de shRNA per ErbB3 basats en pLKO.1, on GCT27-EV és el control sense seqüència shRNA i les GCT27-shErbB3.1 i GCT27-shErbB3.2 eren dues línies amb dos constructes lentivirals independents. A) Anàlisi dels nivells d'expressió dels diferents receptors ErbBs en les tres línies cel·lulars GCT27sh. Els nivells d'expressió d'ErbB3 en les GCT27-shErbB3s eren menors respecte la GCT27-EV, encara que la inhibició en la GCT27-shErbB3.2 era major que en la GCT27-shErbB3.1. L'expressió dels altres receptors, ErbB1, ErbB2 i ErbB4 no variava entre les tres línies. B) Mitjançant anàlisis MTT es va observar com la viabilitat de les GCT27-shErbB3.1 i -.2 es veia reduïda, de manera significativa en ambdós casos, un 39% i un 48% respectivament, respecte la línia control GCT27-EV. Es representa la mitja dels valors obtinguts, amb unitats arbitràries (U.A.) \pm DE * $p \leq 0,05$ respecte les altres dues línies en el test estadístic de la U de Mann-Withney.

A continuació, tal com vam realitzar amb les SuSa-shRNA, vam analitzar l'efecte en la viabilitat cel·lular de la inhibició d'ErbB1 amb gefitinib, d'ErbB1 i ErbB2 amb lapatinib, i d'ErbB3 utilitzant només la línia GCT27-shErbB3.2 que presentava els nivells d'inhibició més elevats mentre que la GCT27-shErbB3.1 només presentava una inhibició d'ErbB3 parcial. Vam tractar les GCT27-EV i les GCT27-shErbB3.2 durant 4 dies amb DMSO, gefitinib 10 μ M i lapatinib 10 μ M, i al final del tractament vam mesurar la proliferació cel·lular amb un assaig MTT. Els resultats obtinguts (Figura R20) mostraven com en les GCT-EV gefitinib no tenia un efecte important en la viabilitat cel·lular, mentre que lapatinib sí que provocava una disminució de la viabilitat cel·lular en un 24%. Per altra banda els efectes de gefitinib i lapatinib en les GCT27-shErbB3.2 eren molt semblants provocant tots dos una disminució del 50% en la viabilitat cel·lular.

Així doncs observàvem com per una banda, la inhibició d'ErbB3 per sí sola afecta al creixement o a la viabilitat cel·lular en dues línies de tumor testicular. Per l'altra banda vam observar en les dues línies de tumor testicular testades que la inhibició dual d'ErbB1 i ErbB3 compromet la viabilitat cel·lular de la mateixa manera que ho fa lapatinib, i en major grau a una inhibició simple dels receptors ErbBs.

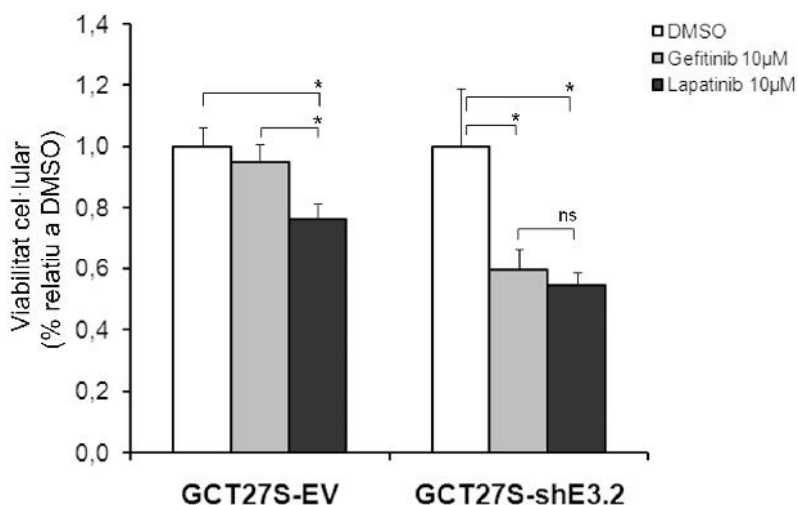


Figura R20. La inhibició combinada d'ErbB1 i ErbB3 redueix la viabilitat de les GCT27. Les GCT27-EV i les GCT27-shERbB3.2 van ser tractades per 4 dies amb DMSO, gefitinib 10 μ M o lapatinib 10 μ M, i es va analitzar l'activitat MTT de cada condició. Els resultats de cada tractament es mostren relatius al tractament amb DMSO corresponent, amb unitats arbitràries (U.A.) \pm DE. *, $p < 0.05$, ns= no significatiu, en el test estadístic de la U de Mann-Whitney.

2. TERÀPIA ANTIANGIOGÈNICA

De manera paral·lela a l'estudi del tractament dirigit a receptors ErbBs vam continuar l'estudi iniciat per la Dra. Willmar Castillo Àvila de la teràpia antiangiogènica en tumors testiculars. Castillo-Avila *et al.* van descriure l'efectivitat de sunitinib, en tres models animals de tumors testiculars ortotòpics de diferent component histològic, així com també en el tumor aparellat del TGT38 amb resistència adquirida a CDDP (Castillo-Avila *et al.*, 2009).

En aquest estudi vam voler testar l'efecte de l'antiangiogènica pazopanib en els models de TGTs *in vivo*, tant sensibles com resistents a CDDP. Pazopanib inhibeix principalment els tres receptors de la família de VEGFRs, PDGFR α i PDGFR β i c-KIT (Kumar *et al.*, 2007); i tot i que l'espectre de dianes és molt semblant al sunitinib, existeixen diferències en d'altres dianes i en la tolerabilitat en els pacients (Escudier *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2009).

2.1 Avaluació de l'efecte *in vivo* de la teràpia antiangiogènica en un model ortotòpic murí de coriocarcinoma testicular humà.

2.1.1 Pazopanib bloqueja el creixement tumoral del TGT38

Per començar vam avaluar l'efecte de pazopanib en el creixement del coriocarcinoma TGT38. Per fer-ho vam implantar el tumor TGT38 en 15 ratolins atímics, i vam procedir a realitzar el tractament de nou animals controls, i sis animals tractats amb pazopanib 100 mg/kg amb administració oral i diària. El punt final venia marcat pel benestar dels animals del grup control. Els resultats dels anàlisis dels volums tumorals finals per a cada grup mostraven com el tractament amb pazopanib bloquejava el creixement tumoral de manera significativa en un 55% (Figura R21).

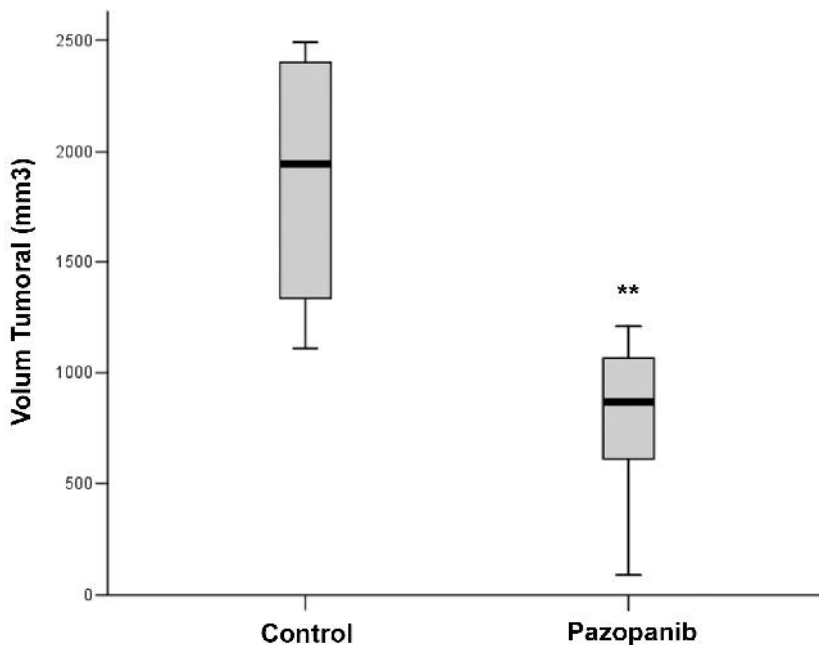


Figura R21. Pazopanib bloqueja en un 55% el creixement tumoral del TGT38. El coriocarcinoma TGT38 es va implantar en ratolins atímics; sis animals es van tractar amb pazopanib 100mg/kg i nou amb la solució de vehicle. Ambdós tractaments van ser d'administració oral diària durant 13 dies. Els resultats dels volums tumorals finals són representats en un diagrama de caixes, *boxplot*. Les medianes per al grup control i el grup pazopanib són de 1946 mm³ i 870 mm³ respectivament. ** p<0,01 en un test de la U de Mann-Withney.

A continuació vam voler comprovar l'efecte antiangiogènica del tractament amb pazopanib. Amb l'objectiu d'analitzar la vasculatura tumoral vam realitzar immunofluorescències marcant amb CD31, un marcador endotelial, en teixits congelats en OCT de tumors dels dos grups de tractament. En els tumors tractats amb pazopanib s'observava clarament un canvi en la vasculatura del tumor, no només en el nombre de vasos presents sinó en la morfologia d'aquests que presenten un lumen més petit i definit (Figura R22A). Així doncs, per tal de poder analitzar aquest canvi en la morfologia dels vasos vam quantificar el nombre d'estructures vasculares i el percentatge que representava l'àrea vascular de cada imatge respecte la total. De cada tumor vam quantificar sis zones viables, i per a cada grup es van analitzar quatre tumors independents. Els dos paràmetres quantificats disminuïen significativament en els tumors tractats amb pazopanib respecte el grup control, un 67% i un 65% respectivament (Figura R22B i C), confirmant un efecte antiangiogènica de pazopanib en el TGT38.

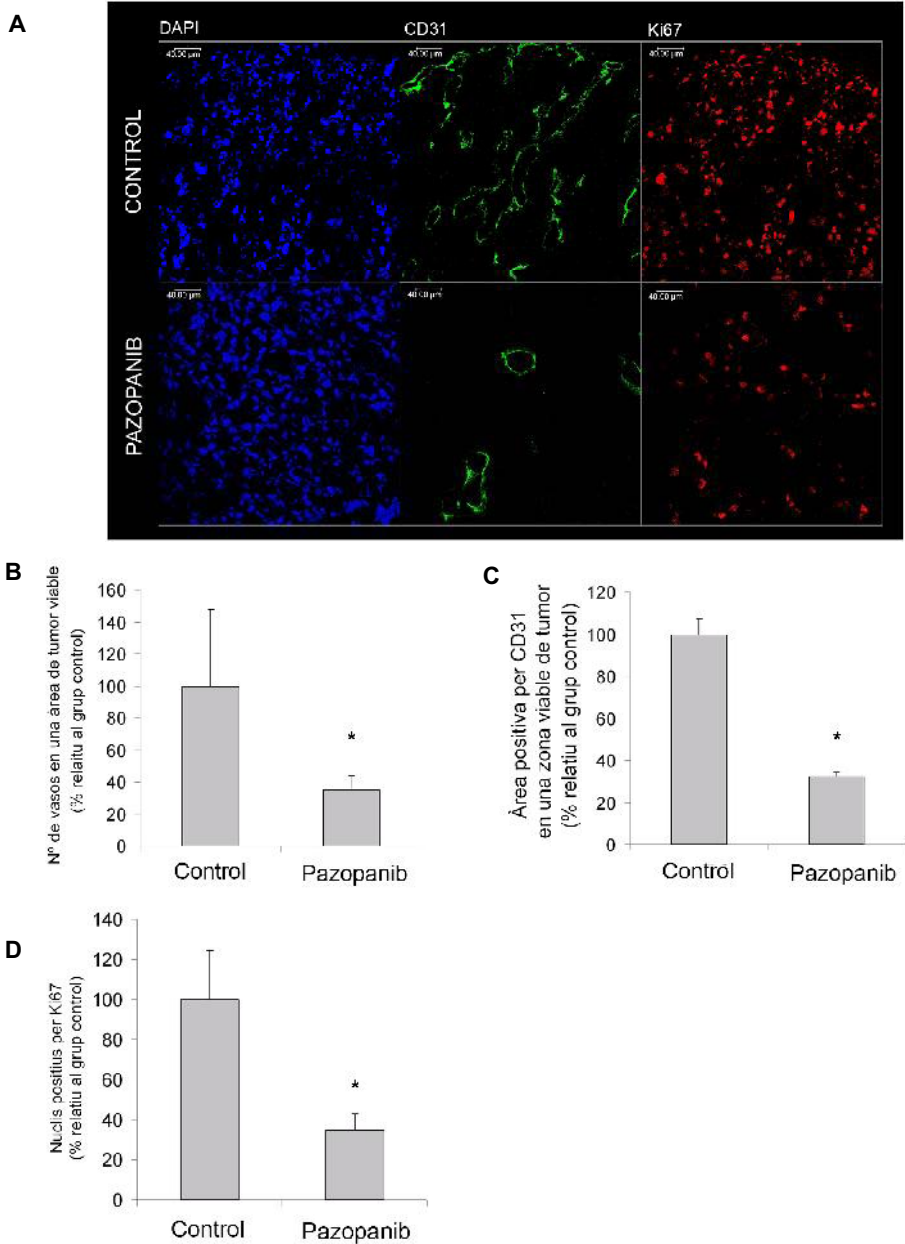


Figura R22. Pazopanib redueix el nombre de vasos, la densitat vascular i la proliferació cel·lular en el TGT38. A) Per immunofluorescència vam analitzar el marcatge de CD31, un marcador endotelial, i Ki67, marcador de proliferació cel·lular. Vam processar quatre tumors de cada grup de tractament, i vam obtenir sis imatges de tumor viable per cada tumor independent. Amb DAPI vam marcar els nuclis. 400x, escala 40 µm. B) Quantificació del nombre d'estructures vasculares en una àrea de tumor viable, C) quantificació del % de l'àrea vascular per àrea viable de tumor i D) quantificació dels nuclis positius per Ki67 en àrea de tumor viable. Ens els tres casos es mostra el % respecte el grup control i es representa la mitjana ± DE. * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann Whitney.

Per altra banda també vam voler analitzar l'efecte de pazopanib en la proliferació de les cèl·lules tumorals. Vam realitzar immunofluorescències amb Ki67, un marcador de proliferació cel·lular, en talls congelats de tumors controls i tractats amb pazopanib. Els nuclis de les cèl·lules es van marcar amb DAPI (Figura R22A). Vam quantificar els nuclis positius per Ki67 respecte el nombre total de nuclis en 4 mostres de tumors controls i 4 mostres de tumors tractats, analitzant sis imatges de teixit viable per cada tumor independent. La quantitat de nuclis positius per a Ki67 disminueix en un 65% en els tumors tractats amb pazopanib (Figura R22D), indicant que pazopanib tenia també un efecte inhibitori de la proliferació de les cèl·lules tumorals.

2.1.2 La combinació dels tractaments amb pazopanib i lapatinib bloqueja de manera sinèrgica el creixement del TGT38

Havent observat que tant lapatinib com pazopanib, administrats individualment, induïen una inhibició del creixement del tumor TGT38 del 50%, i sabent que la seva combinació té efectes citotòxics sinèrgics en diverses línies cel·lulars tumorals *in vitro* (Olaussen et al., 2009), ens vam plantejar una administració conjunta dels dos fàrmacs.

Vam implantar el TGT38 en ratolins atímics i quan es va detectar un tumor palpable a la cavitat abdominal es van randomitzar els ratolins en els grups de tractament control, pazopanib, lapatinib i administració conjunta de pazopanib i lapatinib. Tant lapatinib com pazopanib es van administrar diàriament en les mateixes dosis utilitzades en experiments previs, 100 mg/kg, tant en els grups d'administració simple com l'administració doble. Al final del tractament es van mesurar els volums tumorals per cada grup, i es va observar una reducció del volum tumoral d'un 49% amb lapatinib, d'un 70% amb pazopanib i d'un 88% en el grup d'administració doble (Figura R23).

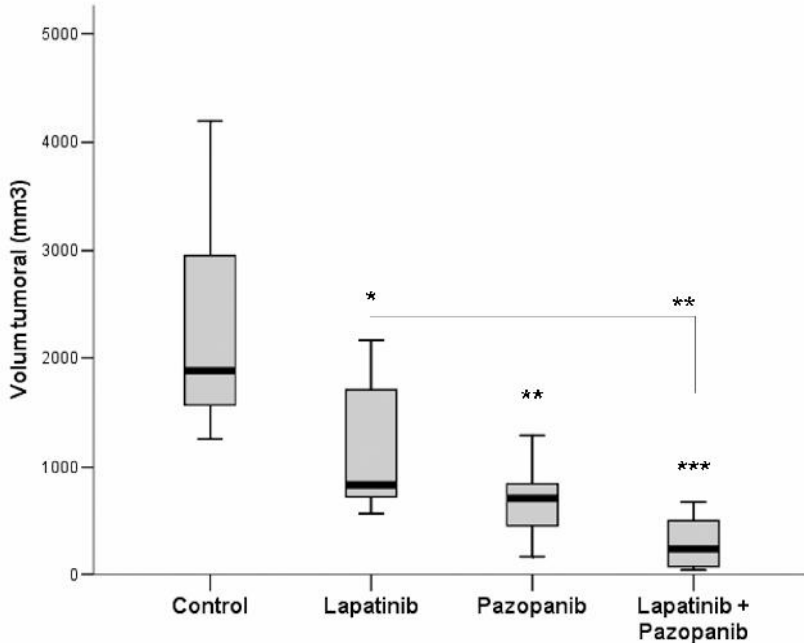


Figura R23. L'administració conjunta de lapatinib i pazopanib inhibeix en un 88% el creixement tumoral del TGT38. El tumor TGT38 es va implantar ortotòpicament en ratolins atímics, i quan el volum tumoral va ser palpable els ratolins es van randomitzar en quatre grups de tractament: 9 animals al grup control tractats amb vehicle, 7 animals al tractament amb lapatinib 100 mg/kg, 8 animals al grup de tractament amb pazopanib 100 mg/kg, i 6 animals al grup d'administració conjunta d'ambdós fàrmacs, tots dos a 100 mg/kg. Al final del tractament es van analitzar els volums tumorals de cada grup. Les mitjanes de volums tumorals obtingudes van ser de 2340 mm³ en el grup control, 1204 mm³ en el grup tractat amb lapatinib, 695 mm³ en el tractament amb pazopanib i 293 mm³ en el tractament combinatòri. En aquesta figura es representen els resultats obtinguts dels volums tumorals de cada un dels grups de tractament en un diagrama de caixes. * p<0,05 ; **<p0,01; ***p<0,001, en el test de la U de Mann-Whitney.

Per tal d'avaluar si l'administració conjunta de lapatinib i pazopanib era sinèrgica vam calcular el coeficient de combinació (CC), que és la relació entre la fracció de volum tumoral (FTV) esperada del tractament amb els dos fàrmacs, respecte la FTV observada de la combinació dels dos fàrmacs. La FTV esperada és el producte de les dues FTV observades amb els fàrmacs per separat (Guerin et al., 2008). De manera que:

$$CC = \frac{FTV(lapa.+pazo.)esperada}{FTV(lapa.+pazo.)observada} = \frac{(FTV(lapa.)observada * FTV(pazo.)observada)}{FTV(lapa.+pazo.)observada}$$

Essent els càlculs realitzats:

$$CC = \frac{\left(\frac{1204 \text{ mm}^3}{2340 \text{ mm}^3} \cdot \frac{695 \text{ mm}^3}{2340 \text{ mm}^3} \right)}{\left(\frac{293 \text{ mm}^3}{2340 \text{ mm}^3} \right)} = \frac{0,153}{0,125} = 1,22$$

Quan $CC > 1$ es pot parlar d'efectes sobre-additius entre els dos fàrmacs. El CC de l'administració combinada de lapatinib i pazopanib va resultar ser de 1,22 així doncs podíem assumir que els efectes sobre el volum tumoral de lapatinib conjuntament amb pazopanib havien sigut sinèrgics en el TGT38. No vam observar pèrdua de pes deguda a cap dels tractaments.

Tal com vam realitzar en el tractament amb pazopanib, vam analitzar l'efecte de l'administració conjunta de lapatinib i pazopanib en la vasculatura analitzant l'expressió de CD31 en mostres de tumors dels quatre grups de tractament (Figura R24A).

En les imatges obtingudes ja es podia observar a simple vista que l'estructura dels vasos en els tumors del tractament combinat respecte els tumors control canviava, disminuint el seu tamany i adoptant una estructura més rodona, fenotip que compartien també els tumors tractats amb pazopanib. Al quantificar el percentatge d'àrea positiva per CD31 també en una àrea viable de tumor (Figura R24B) i el nombre de vasos en una àrea viable de tumor (Figura R24C), tant en el tractament simple amb pazopanib com en el tractament combinat de pazopanib amb lapatinib, observàvem disminucions significatives respecte el grup control. Obtenint una disminució en l'àrea positiva per CD31 del 67% amb el tractament de pazopanib i del 79% en el tractament combinat; i una reducció del 67% i del 74% respectivament, del nombre de vasos.

Per altra banda, el tractament amb lapatinib no va afectar a la vasculatura tumoral, i no es va observar una reducció significativa ni en nombre de vasos ni en percentatge d'àrea positiva per CD31. Així doncs podíem assumir que l'efecte antiangiogènec en el grup combinatori era degut a pazopanib.

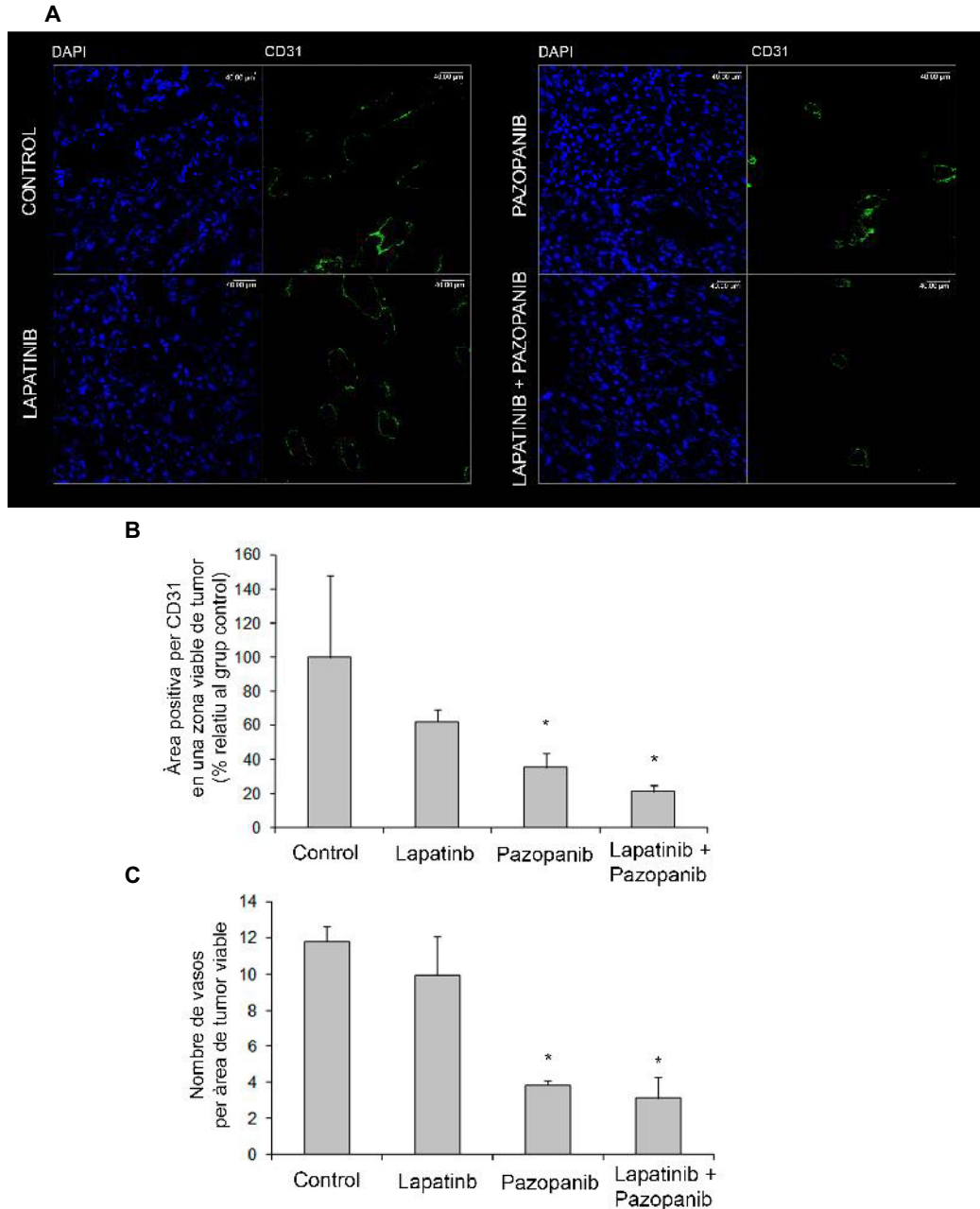


Figura R24. El tractament combinat de lapatinib i pazopanib té efectes antiangiogènics, com el tractament simple de pazopanib. A) Imatge representativa del marcatge per immunofluorescència de CD31, marcador de proliferació cel·lular, i els nuclis marcats amb DAPI en tumors dels quatre grups de tractament: control, lapatinib, pazopanib i lapatinib + pazopanib. 400x, escala 40 μ m. B) Quantificació del nombre d'estructures vasculars per àrea de tumor viable en els quatre grups de tractament i C) quantificació de l'àrea positiva per CD31 per àrea de tumor viable, en els quatre grups de tractament. Es van analitzar 4 tumors de cada grup, i sis imatges de tumor viable per cada tumor independent. En les quantificacions es mostra el % respecte el grup control i es representa la mitjana \pm DE. * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann Whitney.

2.2 Avaluació de l'efecte *in vivo* de la teràpia antiangiogènica en un nou model ortotòpic murí de tumor de sac vitel·lí testicular humà refractari a cisplatí

Dels pacients diagnosticats amb TGT existeix un petit grup de pacients que presenten resistència a la teràpia estàndard quimioteràpèutica basada en CDDP, és per això que es necessita un tractament alternatiu al quimioterapèutic (Koychev et al., 2011).

En el nostre grup es va publicar l'eficàcia de sunitinib en el TGT38R, un tumor resistent a CDDP (Castillo-Avila et al., 2009). Aquest tumor era la parella del TGT38 amb resistència adquirida després d'una administració continuada de CDDP essent ja un tumor ortotòpic. Havent testat ja un antiangiogèn en el TGT38R, vam voler analitzar l'efecte de pazopanib en un altre model de tumor testicular resistent a cisplatí, però on la refractarietat es va originar en el pacient humà.

2.2.1 Caracterització del TGT44

El TGT44 era un nou model de tumor testicular ortotòpic que provenia d'una metàstasi retroperitoneal de tumor testicular de components mixtes, on el pacient va presentar refractarietat a la primera línia de quimioteràpia basada en CDDP. El model animal va ser establert per el Dr. Alberto Villanueva amb la col·laboració del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Un cop implantat el tumor en els passatges inicials es va tractar amb CDDP per tal de comprovar la seva resistència i obtenir mostres del TGT44 tractat amb CDDP.

A continuació vam procedir a caracteritzar el TGT44 a nivell histològic i comparar-lo amb el tumor primari, la peça originària de metàstasi retroperitoneal, i el mateix tumor TGT44 tractat amb 4 dosis setmanals de 4 mg/kg de CDDP. Aquests anàlisis es van realitzar amb la col·laboració del Dr. August Vidal del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Les mostres es van processar realitzant tincions immunohistoquímiques característiques per a tumors testiculars: hematoxilina-eosina (Figura R25 A-F); (G-I) immunotinció de citoqueratina CAM5.2; (J-L) immunotinció de EMA; i (M-O) immunotinció de AFP.

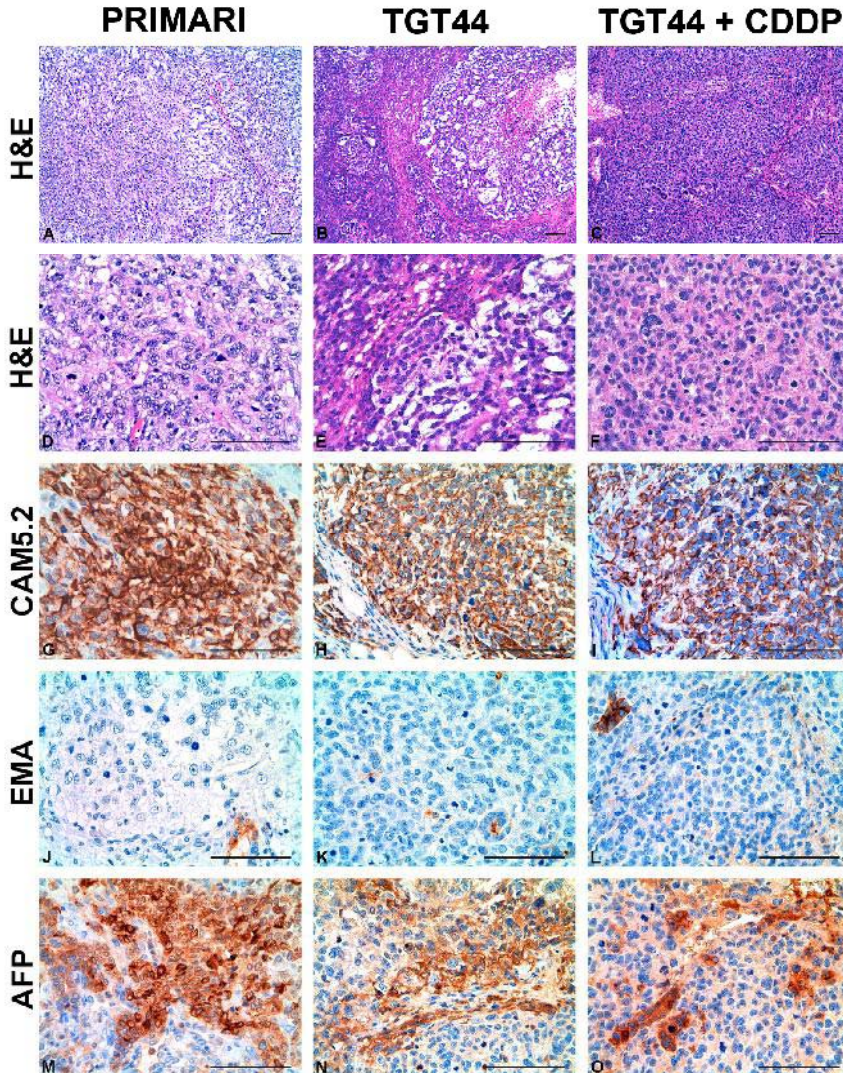


Figura R25. Caracterització histològica de TGT44. Immunohistoquímiques del tumor primari, del TGT44 i del TGT44 tractat amb 4 administracions de 4 mg/kg de CDDP. (A-F) Tinció d'hematoxilina-eosina (A-C: 150X escala 100 µm; D-F: 400x escala 100 µm); (G-I) Immunotinció de CAM 5.2; (J-L) Immunotinció d'EMA; (M-O) Immunotinció de AFP. 400x escala 100µm.

El perfil immunohistoquímic era semblant en la metàstasi original i en els dos tumors TGT44 analitzats, tractats o no amb CDDP. Els tumors eren característics de sac vitel·lí amb una extensa expressió de la citoqueratina CAM5.2, expressió focal de EMA i una reactivitat a AFP (Figura R26A) irregular. Els resultats obtinguts indicaven que la peça quirúrgica era de component mixte, amb teratoma i sac vitel·lí, i on aquest últim era el component que havia crescut en el tumor ortòpic.

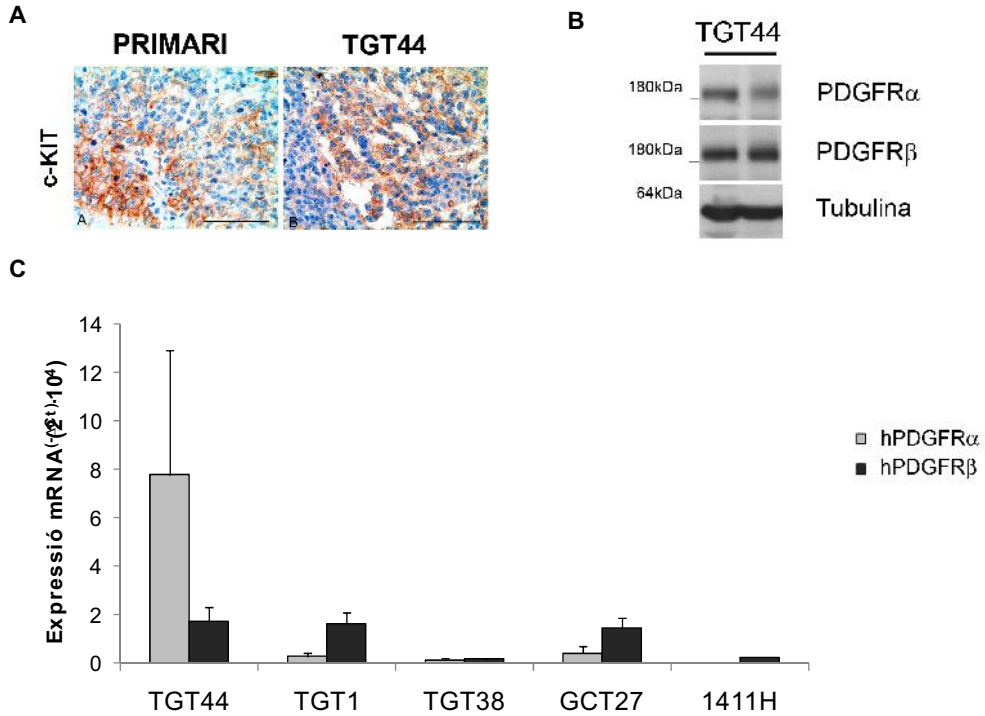


Figura R26. Les dianes de pazopanib s'expressen en el TGT44. A) Immunohistoquímica de c-KIT en el tumor primari i en el TGT44. 400x, escala 100 μ m. B) Anàlisi de l'expressió de PDGFR α i PDGFR β per *western blot*, en dues mostres independents de TGT44. Tubulina com a control de càrrega. C) Els nivells de mRNA dels receptors humans PDGFR α i PDGFR β es van analitzar per RT-PCR en 4 mostres independents de TGT44, TGT1 i TGT38. També en 5 mostres de cèl·lules GCT27S i una de 1411H. Els resultats es representen amb la mitja \pm DE del $2^{-(\Delta Ct)} \cdot 10^4$.

A continuació vam avaluar la presència de les dianes de pazopanib en aquest model tumoral. Per una banda vam confirmar la presència de c-KIT per tinció immunohistoquímica (Figura R26A). Per altra banda vam detectar per *western blot* l'expressió dels dos receptors PDGFR α i PDGFR β en dos tumors independents TGT44 (Figura R27B). Els nivells d'mRNA d'ambdós receptors es van analitzar per RT-PCR en mostres independents de TGT44, i també en altres tumors ortotòpics com el TGT38 i el TGT1, un altre tumor de component de sac vitel·lí (Castillo-Avila et al., 2009), així com en les cèl·lules de tumor testicular GCT27 i les 1411H (Figura R27C). Al comparar l'expressió dels receptors entre aquestes mostres vam observar que el TGT44 expressava elevats nivells dels dos receptors.

2.2.2 Avaluació de l'efecte de pazopanib en el TGT44

Un cop caracteritzat el TGT44 com un model de tumor testicular de component de sac vitel·lí d'origen metastàtic i refractari a CDDP, i comprovada la presència dels receptors diana de pazopanib, ens vam disposar a testar l'efecte de pazopanib en aquest model tumoral.

Amb aquest propòsit vam implantar el tumor en ratolins atímics, que vam randomitzar en tres grups de tractament un cop vam detectar un volum de tumor palpable. 3 animals es van tractar com a grup control, seguint els esquemes dels altres tractaments però amb les solucions de vehicle corresponents. 3 animals es van tractar amb 4 dosis intraperitoneals de 4 mg/kg de CDDP, les 4 primeres setmanes. 4 animals es van tractar amb 100 mg/kg de pazopanib amb administració oral i diària. El tractament va ser de sis setmanes, el punt final del qual va ser determinat per el creixement dels tumors del grup control i pel benestar d'aquests animals.

A punt final de tractament vam analitzar els volums tumorals de cada grup. En primer lloc vam confirmar la resistència a CDDP al no observar una diferència significativa entre els tumors tractats amb CDDP o amb vehicle. Pel que fa al tractament amb pazopanib vam observar una reducció del creixement tumoral, estadísticament significativa, del 60% (Figura R27).

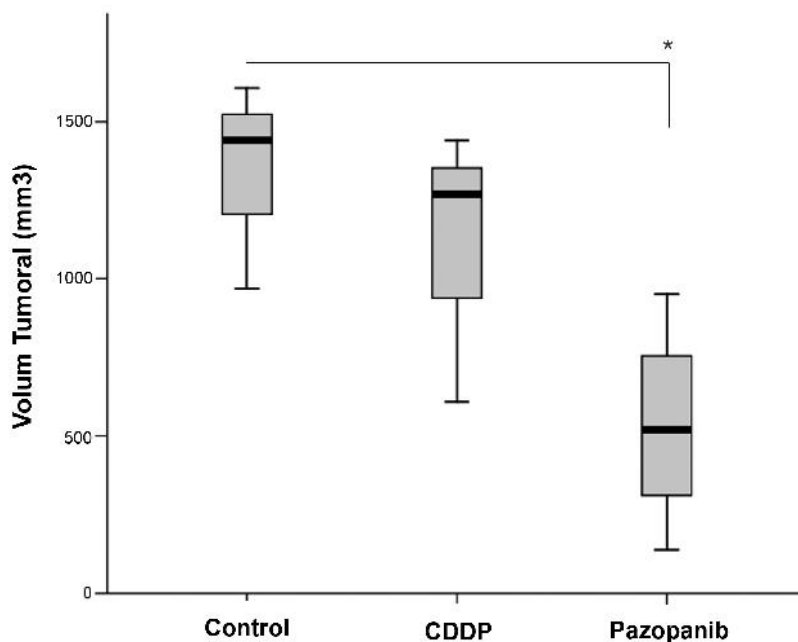


Figura R27. Pazopanib inhibeix el creixement d'un tumor refractari a CDDP. El tumor TGT44 es va implantar en ratolins atímics, i quan es va detectar una massa intraperitoneal palpable aquests es van randomitzar en tres grups de tractament: tres animals es van tractar amb 4 dosis setmanals de CDDP 4 mg/kg intraperitoneal; a quatre animals se'ls va administrar de manera oral i diària pazopanib a 100 mg/kg; els tres animals del grup control van ser administrats amb el vehicle corresponent seguint els patrons de tractament de cada un dels altres grups de tractament. En aquesta figura es representen els volums tumorals finals per cada grup de tractament en un gràfic de diagrama de caixes. * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann-Whitney.

A continuació vam analitzar l'efecte del tractament amb pazopanib en la vasculatura del TGT44. Tal i com havíem realitzat anteriorment en el TGT38 vam analitzar el marcatge de CD31 en els tumors congelats en OCT dels grups control i pazopanib (Figura R28A). Per avaluar aquest marcatge vam quantificar el nombre de vasos i l'àrea positiva per a CD31 respecte l'àrea total de tumor viable. Tot i ser un tumor menys vascularitzat que el coriocarcinoma TGT38, vam poder observar una reducció significativa dels dos paràmetres avaluats en els tumors tractats amb pazopanib (Figura R28 B i C).

Així doncs pazopanib tenia un efecte antitumoral i antiangiogènica en un tumor d'origen refractari a CDDP.

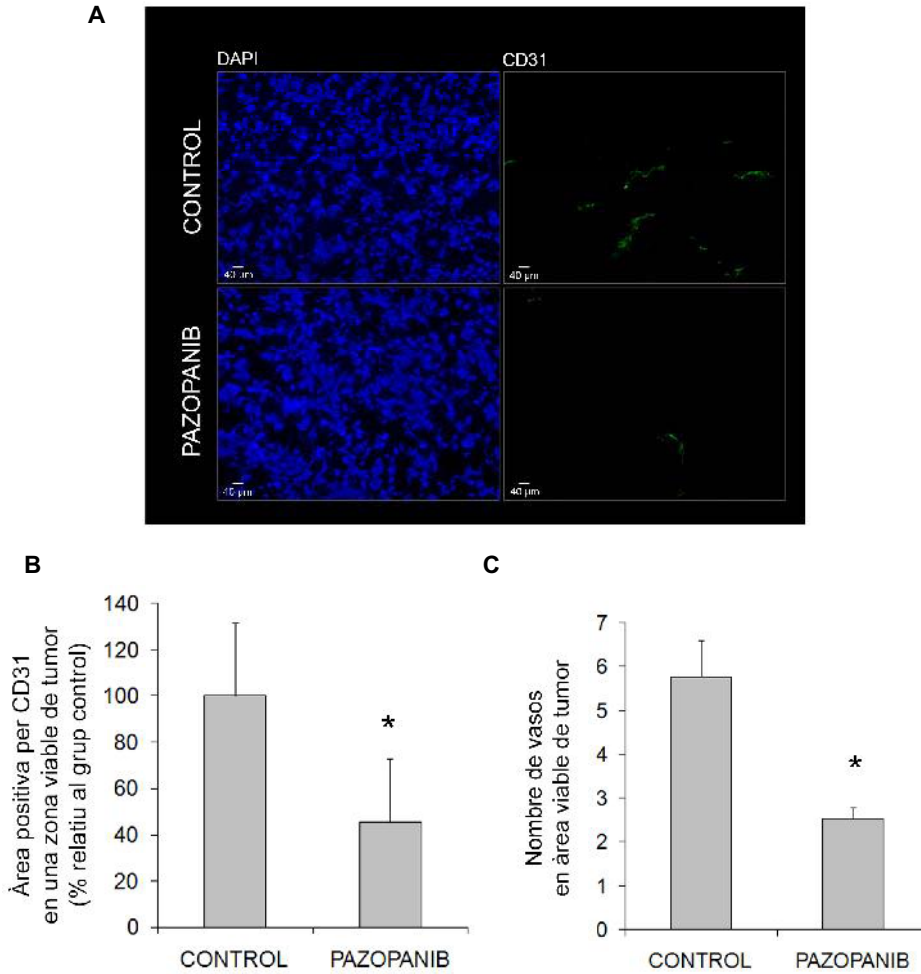


Figura R28. El tractament amb pazopanib redueix la densitat vascular en el TGT44. A) Imatge representativa del marcatge per immunofluorescència del marcador de cèl·lula endotelial, CD31. Els nuclis han estat marcats amb DAPI. 200x, escala 40 μm. B) Quantificació de l'àrea positiva per CD31 en una àrea de tumor viable, i C) quantificació del nombre de vasos en una àrea de tumor viable. Es van analitzar tres tumors control i quatre tumors tractats amb pazopanib, i sis imatges de tumor viable per cada tumor independent. Es representa la mitjana ± DE. C) valors relatiu al grup control. * $p < 0,05$ en un test de la U de Mann Whitney.

2.3 Estudi de l'efecte directe de pazopanib en cèl·lules tumorals sensibles i resistentes a CDDP

Teníem demostrada l'eficàcia de pazopanib en la inhibició del creixement de dos models de tumors humans testiculars implantats ortotòpicament en ratolins atímics, un d'ells sensible i l'altre resistent a CDDP. Per ampliar l'estudi vam voler estudiar l'efecte directe de pazopanib en les cèl·lules tumorals amb fenotip sensible o resistent a CDDP. Amb aquest objectiu doncs, vam seleccionar dues línies cel·lulars de tumor testicular humà les GCT27 i les SuSa, on a cada una de les línies parentals li corresponia la seva parella de resistència a CDDP adquirida (Taula R3).

Línia Cel·lular	Origen	Component histològic	Referències
GCT27S	Primari	CE	(Pera et al., 1987)
GCT27R	Primari	CE	(Kelland et al., 1992)
SuSaS	Primari	CE, T	(Hogan et al., 1977)
SuSaR	Primari	CE, T	(Walker et al., 1990)

Taula R3. Parelles de línies cel·lulars de tumor testicular humà sensibles i resistentes a CDDP. NSGCT= Tumor de cèl·lula germinal no seminomatós; CE=Carcinoma embrionari; T=teratoma. Taula adaptada de Fung *et al.* (Fung et al., 2006)

2.3.1 Efecte de pazopanib en la viabilitat cel·lular de les GCT27S i GCT27R

En primer lloc vam voler comprovar la resistència i sensibilitat a CDDP en cada una de les parelles de línies cel·lulars, les GCT27S-R i les SuSaS-R. Per això vam tractar les cèl·lules durant 4 dies amb diferents dosis de CDDP. Al final del tractament vam realitzar un assaig MTT per mesurar la viabilitat cel·lular. Els resultats obtinguts mostraven com efectivament les GCT27S i les SuSaS eren més sensibles a CDDP que les GCT27R i les SuSaR respectivament (Figura R29A i B). La diferència de les IC50s entre SuSa parentals i les resistentes a CDDP va ser de 2,8 vegades, essent les IC50s de $3,9 \cdot 10^{-5}$ i de $1,1 \cdot 10^{-4}$ mg/ml respectivament. En el cas de les GCT27 la diferència observada va ser molt semblant, de 2,6 vegades, amb els valors de IC50s de $2,4 \cdot 10^{-4}$ i de $6,2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml per a les parentals i les resistentes respectivament (Taula R4).

	IC50	DE	valors de p
SuSaS	3,90E-05	± 8,8E-06	
SuSaR	1,10E-04	± 1,3E-05	0,029
GCT27S	2,40E-04	± 5,8E-05	
GCT27R	6,20E-04	± 1,4E-04	0,029

Taula R4. Valor de les IC50s per CDDP obtinguts en les cèl·lules SuSaS, SuSaR, GCT27S i les GCT27R La IC50 és la conentració inhibidora del 50%, DE és la desviació estandard. Valors estadístics obtinguts en test de la U de Mann-Withney.

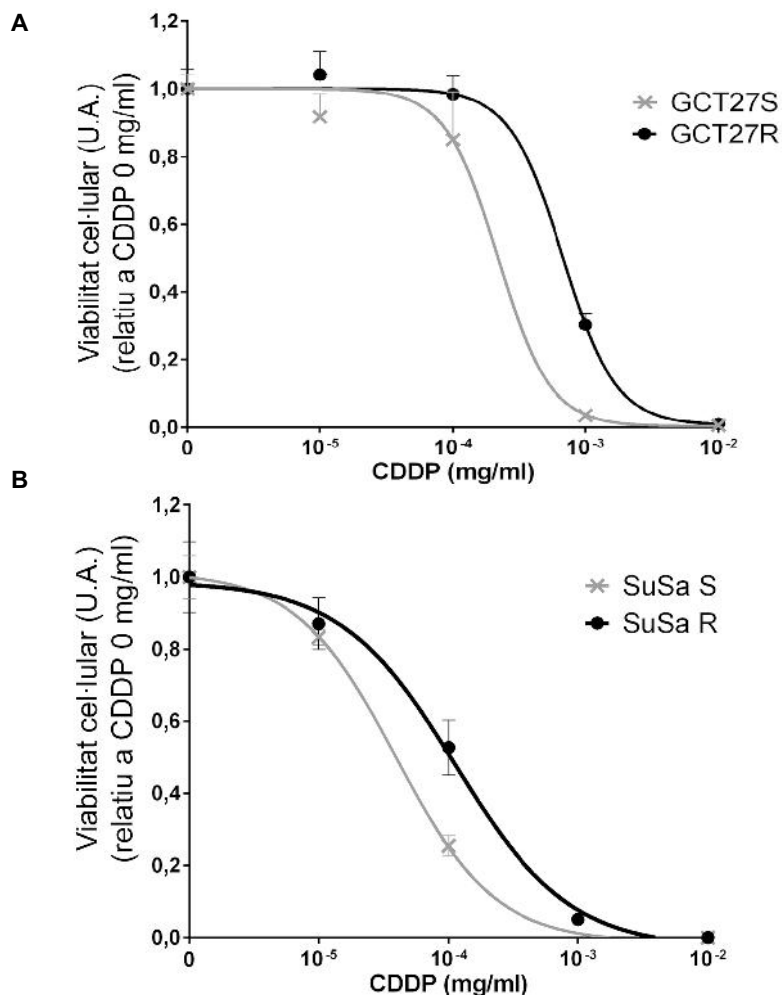


Figura R29. Caracterització de dues parelles de línies cel·lulars testiculars sensibles i resistents a CDDP. Les dues parelles de línies testiculars A) GCT27S i GCT27R, i B) SuSaS i SuSaR, van ser tractades durant 4 dies amb diferents dosis de CDDP, de 0 a 0,01 mg/ml. Al final del tractament la viabilitat cel·lular va ser mesurada en assaig d'incorporació MTT. Es representa la mitjana obtinguda en cada punt, en unitats arbitràries (U.A.), ± DE. Els valors obtinguts de les IC50s es mostren en la taula R4.

Un cop comprovat el fenotip sensible i resistent a CDDP de les dues parelles de línies cel·lulars, vam avaluar l'efecte de pazopanib en les GCT27S i les GCT27R. Vam tractar les dues línies cel·lulars durant 4 dies amb dosis de pazopanib de 0 a 10 µg/ml. Al final del tractament vam analitzar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig incorporació MTT. Les corbes obtingudes mostraven com encara que no variava la sensibilitat al fàrmac, la inhibició màxima de pazopanib en les cèl·lules resistents a CDDP era més elevada que en les sensibles. A la concentració de 2 µg/ml de pazopanib les GCT27S arribaven al seu màxim d'inhibició de viabilitat cel·lular, essent en les GCT27S del voltant del 70% i en les GCT27R del 90% (Figura R30A). Aquest mateix efecte en la viabilitat de les cèl·lules el vam observar quan vam tractar les mateixes cèl·lules amb diferents dosis de sunitinib, un altre fàrmac antiangiogènica que comparteix les principals dianes amb pazopanib (Figura R30B).

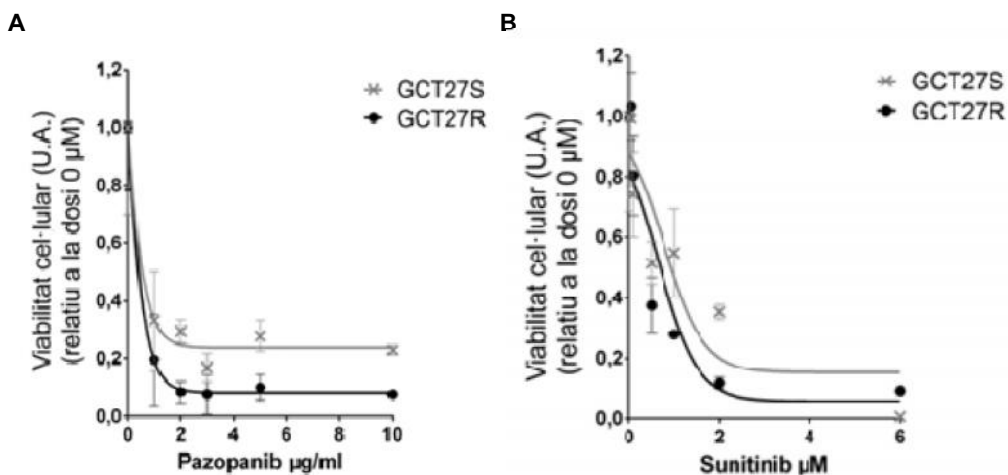


Figura R30. L'efecte de pazopanib o sunitinib és major en les GCT27R. Les GCT27S i les GCT27R es van tractar durant 4 dies amb diferents dosis de A) pazopanib, de 0 a 10 µg/ml, o amb B) sunitinib, amb dosis compreses entre 0 i 6 µM. Al final dels tractaments es va mesurar la viabilitat cel·lular de cada condició mitjançant un assaig MTT. Es representa la mitjana obtinguda en cada punt, en unitats arbitràries (U.A.), ± DE.

2.3.2 Activació del *loop* autocrí PDGF-BB/PDGFR β /AKT com a mecanisme de resistència en les GCT27R

Com ja hem comentat extensament en la introducció d'aquest estudi (veure apartat Introducció 1.7.2) existeixen múltiples mecanismes, no excloents entre ells, que confereixen resistència a CDDP; la majoria es basen en alteracions en els mecanismes d'incorporació del fàrmac intracel·lular, en alteracions dels mecanismes de reparació del DNA o en alteracions que acaben eludint l'apoptosi, ja sigui per defectes en la mateixa maquinària de mort cel·lular o en les vies de senyalització que en condicions normals condueixen en apoptosi (Galluzzi et al., 2012). En aquest últim cas s'hi han identificat diversos mecanismes, com la inactivació de p53 (Siddik, 2003), alteracions en la via de Ras/MAPK (Brozovic and Osmak, 2007), en la via de NF- κ B (Pommier et al., 2004) o en la via de PI3K/AKT (Galluzzi et al., ; Pommier et al., 2004), on diversos estudis han descrit la involucració d'AKT amb el fenotip resistent a CDDP (Huang and Hung, 2009). Per estudiar si aquest mecanisme podia ocórrer en les línies cel·lulars resistents a CDDP que estàvem utilitzant, vam analitzar els nivells d'AKT fosforilat i AKT total en les GCT27S i R i en les SuSaS i R. Ja que ERK1/2 era també una via proliferativa i antiapoptòtica, amb paper descrit en resistència a CDDP, en vam analitzar els nivells d'activitat en els dos parells de cèl·lules.

Així doncs vam analitzar per *western blot* els nivells de pAKT, d'AKT total, de pERK1/2 i d'ERK1/2 total. Els resultats van mostrar que AKT es trobava clarament més actiu en els fenotips resistents de les dues parelles de cèl·lules, i els nivells d'activitat d'ERK1/2 no variaven de manera significativa (Figura R31).

La sobreactivació d'AKT en les cèl·lules resistents a CDDP podria venir deguda a una mutació intrínseca en AKT; una alteració de la regulació de la via de PI3K; o bé d'una alteració per sobre la via de senyalització, com per exemple podria ser en algun receptor que augmentés la seva activitat (Yuan and Cantley, 2008).

Per avaluar si la sobreactivació d'AKT podia ser deguda a una pròpia alteració de la via PI3K, vam avaluar els nivells d'expressió de PTEN, la fosfatasa antagonista de l'activitat PI3K. Vam analitzar per *western blot* els nivells de PTEN en les cèl·lules GCT27S i les GCT27R (Figura R31A) però els nivells de PTEN no variaven entre les cèl·lules sensibles i les resistents a CDDP. Per altra banda la possibilitat d'una mutació que aportés activitat constitutiva a AKT va quedar descartada quan al depleccionar les

cèl·lules GCT27R, retirant el sèrum del medi, es disminuïen els nivells de pAKT (Figura R33).

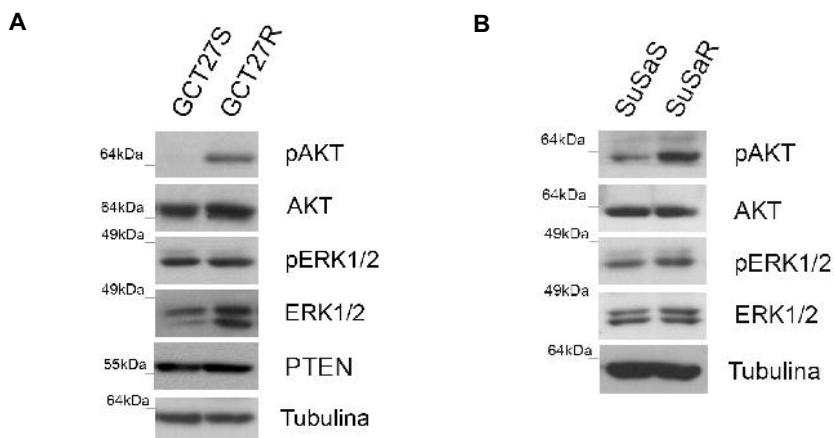


Figura R31. AKT es troba més actiu en les cèl·lules resistents a CDDP. Es van analitzar els nivells de pAKT, AKT total, pERK1/2, ERK1/2 total, PTEN (nomès en A) i la tubulina com a control de càrrega en les cèl·lules A) GCT27S i les GCT27R; i en les B) SuSaS i les SuSaR.

Així doncs vam decidir analitzar una possible alteració per sobre la via de PI3K/AKT. PI3K senyalitza a *downstream* de múltiples tipus de receptors de superfície, entre ells molts són receptors tirosina cinasa (Yuan and Cantley, 2008). Amb el propòsit d'avaluar si algun receptor tirosina cinasa podria estar involucrat en els elevats nivells d'AKT en les GCT27R, vam analitzar l'activitat d'AKT en resposta a inhibidors i lligands de diferents receptors tirosina cinasa.

En primer lloc vam tractar les GCT27R amb diferents inhibidors de receptors tirosina cinasa i vam analitzar l'activitat d'AKT i ERK1/2 per *western blot*. Vam tractar les cèl·lules amb pazopanib i sunitinib que inhibien VEGFRs, PDGFRs i c-KIT; gefitinib que bloquejava ErbB1, l'inhibidor dual d'ErbB1 i ErbB2 lapatinib; Ly2109761 que bloqueja el TGF β RII, i amb Ly294002 i UO126, inhibidors de PI3K i ERK1/2 respectivament que vam utilitzar com a controls positius. Els resultats van mostrar que dels 5 inhibidors administrats tant sols pazopanib i sunitinib bloquejaven l'activitat d'AKT en les GCT27R, i ho feien en els mateixos nivells que l'inhibidor específic de PI3K Ly294002. Per altra

banda l'activitat d'ERK1/2 no es veia afectada amb aquests inhibidors, demostrant una inhibició específica d'AKT (Figura R32).

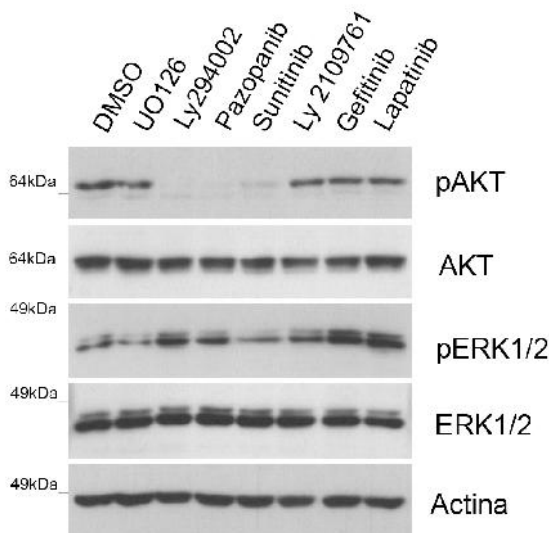


Figura R32. Pazopanib i sunitinib bloquejen l'activitat d'AKT en les cèl·lules GCT27R.

Les GCT27R, en creixement exponencial, van ser tractades durant 3 hores amb UO126 10 μ M, Ly294002 15 μ M, pazopanib 5 μ g/ml, sunitinib 10 μ M, Ly2109761 10 μ M, gefitinib 10 μ M i lapatinib 10 μ M. Els nivells d'expressió de pAKT, AKT, pERK1/2, ERK1/2 i l'actina com a control de càrrega, es van analitzar per *western blot* en els lisats proteics.

Vam continuar l'estudi amb l'estratègia contrària: analitzar l'estimulació d'AKT en resposta a diferents lligands. Vam estimular les cèl·lules GCT27S i les GCT27R, depleccionades amb medi sense sèrum, i estimulades 10 minuts amb PDGF-BB, EGF i FGF-2 i vam analitzar l'activitat d'AKT i ERK1/2 (Figura R33). Els nivells de pERK1/2 s'incrementaven en les tres condicions d'estimulació respecte la condició basal i de la mateixa manera en les dues línies cel·lulars. Els nivells d'ERK total no es veien alterats. Per altra banda AKT només s'activava amb el tractament de PDGF-BB, i en nivells molt més elevats en les GCT27R que en les GCT27S, on es pot observar un increment, encara que molt més suau, dels nivells de pAKT.

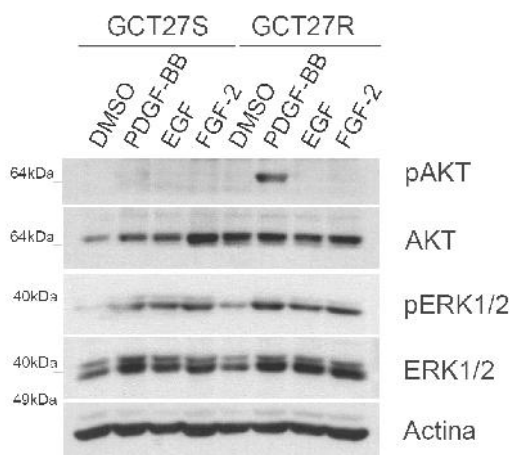


Figura R33. AKT s'activa en les GCT27R amb PDGF-BB. Les GCT27S i les GCT27R es van depleccionar en condicions de de 0% FBS tota la nit, i es van estimular durant 10 minuts amb PDGF-BB (20ng/ml), EGF (20ng/ml) o FGF-2 (20ng/ml). En lisats proteics obtinguts es van analitzar per *western blot* els nivells d'pAKT, AKT total, pERK1/2, ERK1/2 total i l'actina com a control de càrrega.

Tot seguit volíem confirmar que pazopanib era capaç d'inhibir l'activació d'AKT induïda pel lligand PDGF-BB. Vam sotmetre les cèl·lules GCT27S i GCT27R a tres condicions: la condició basal, amb medi sense sèrum; estimulació amb PDGF-BB i estimulació amb el lligand en presència de pazopanib. Els resultats van mostrar com efectivament pazopanib inhibia l'activació d'AKT induïda per PDGF-BB (Figura R34).

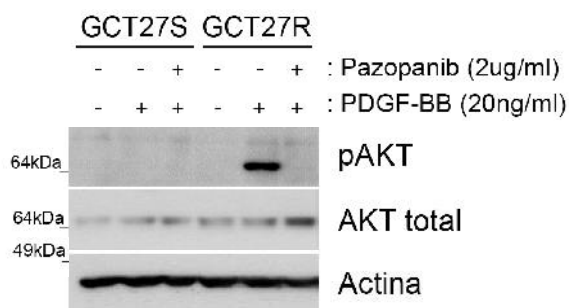


Figura R34. Pazopanib inhibeix l'activació d'AKT induïda per PDGF-BB en les GCT27R. Les GCT27S i les GCT27R, en condicions de 0% FBS, es van estimular durant 10 minuts amb PDGF-BB (20ng/ml) amb presència i absència de pazopanib (2 µg/ml). Per *western blot* es va analitzar l'expressió de pAKT, AKT total i l'actina com a control de càrrega.

Haviem observat per una banda que l'activitat d'AKT només s'inhibia quan tractàvem les GCT27R amb pazopanib o sunitinib, inhibidors, entre d'altres dels PDGFRs, i per l'altre que AKT s'activava amb PDGF-BB. Els resultats obtinguts suggerien una involucració dels receptors PDGFRs en l'activació d'AKT en les GCT27R. El següent pas va ser doncs analitzar els nivells d'expressió dels receptors PDGFR α i PDGFR β en les GCT27S i les GCT27R.

Vam analitzar els nivells d'expressió de l'mRNA dels dos receptors per RT-PCR, i els resultats obtinguts ens van mostrar que els nivells de PDGFR β incrementaven 2,5 vegades més en les GCT27R que en les GCT27S, i els nivells de PDGFR α disminuïen 3 vegades en les GCT27R (FiguraR35A). També vam analitzar en aquestes cèl·lules els nivells d'expressió dels mRNAs de dos lligands d'ambdós receptors, PDGF-A i PDGF-B (Figura R34B). Els resultats obtinguts van indicar que a diferència de PDGF-A, PDGF-B estava sobreexpressat 6,5 vegades més en les GCT27R que en les GCT27S. L'expressió de PDGF-A era 2,5 vegades menor en les GCT27R que en les GCT27S però la diferència no era significativa.

A continuació, analitzant per *western blot* els nivells proteics d'expressió de PDGFR α i PDGFR β en les GCT27S i R, vam confirmar els resultats obtinguts per RT-PCR i vam observar una sobreexpressió de PDGFR β en les cèl·lules resistents, mentre que els nivells de PDGFR α no variaven (FiguraR35C). A més a més vam analitzar l'expressió d'ambdós receptors en l'altre parella de cèl·lules, les SuSaS i les SuSaR i els resultats obtinguts van ser els mateixos. Els nivells de PDGFR β en les cèl·lules resistents eren més elevats, mentre que els nivells proteics de PDGFR α no variaven entre línies (FiguraR35D).

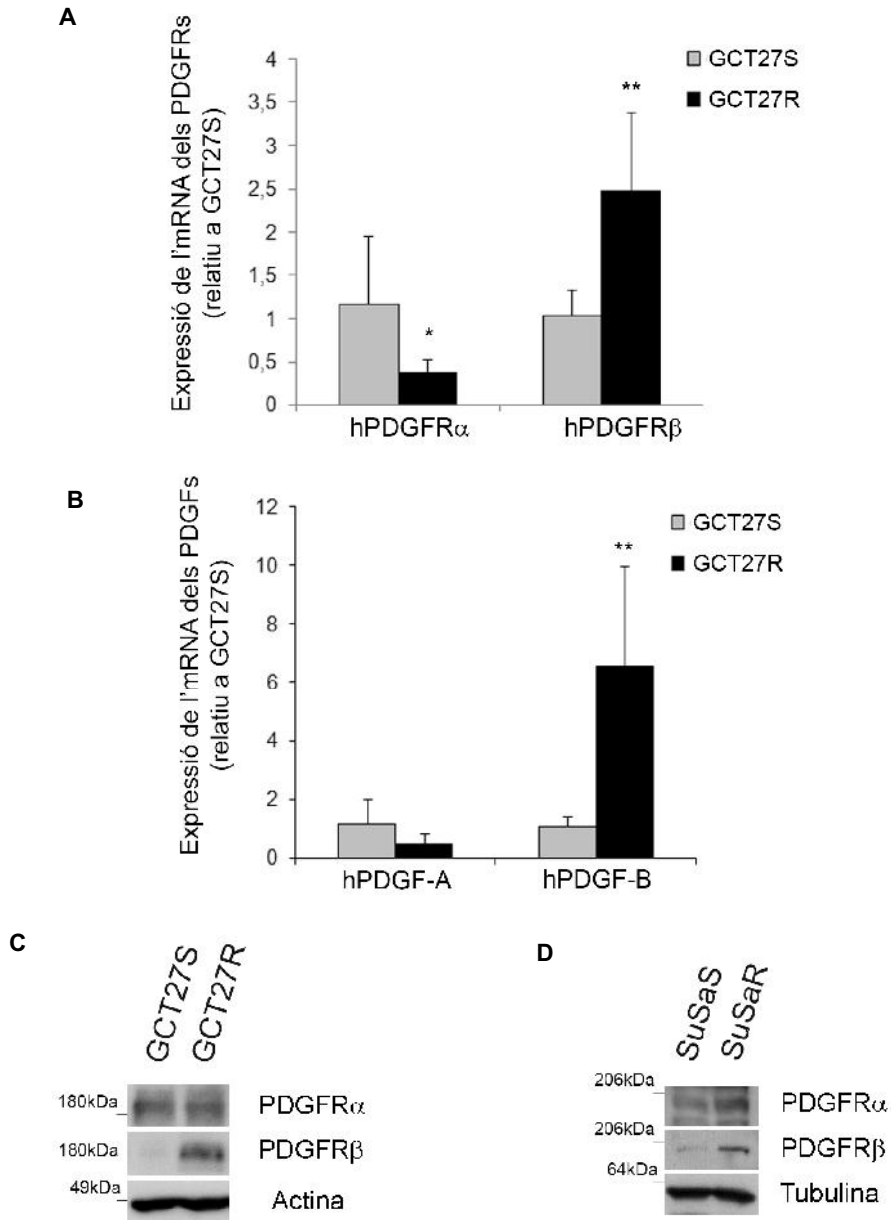


Figura R35. PDGFR β es troba sobreexpressat a nivell de mRNA i de proteïna en les GCT27R respecte les GCT27S. A) Es van analitzar els nivells d'expressió dels mRNA dels receptors PDGFR α i PDGFR β en les GCT27S i les GCT27R per RT-PCR. Els resultats s'expressen relativitzats als nivells d'expressió a GCT27S \pm DE. B) També es van analitzar els nivells d'expressió dels mRNAs de PDGF-A i PDGF-B en les GCT27S i les GCT27R. Els resultats s'expressen relativitzats als nivells d'expressió a GCT27S \pm DE. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en el test estadístic de la U de Mann-Whitney. Els nivells d'expressió de PDGFR α i PDGFR β també es van analitzar per *western blot* en les C) GCT27S i R, i en les D) SuSaS i R. L'actina i la tubulina com a control de càrrega.

Els resultats obtinguts fins al moment mostraven l'activació d'un *loop* autocrí que involucrava PDGF-B, PDGFR β i AKT. La següent qüestió era analitzar si aquest via era un mecanisme que aportava resistència a CDDP en les GCT27R.

Per saber si la sobreexpressió de PDGFR β participava en la resistència a CDDP en les GCT27, vam analitzar la resposta de la viabilitat cel·lular a CDDP en presència o absència de pazopanib. Vam realitzar les corbes de dosi resposta a CDDP, ja mostrades en la Figura R29, tractant les cèl·lules amb DMSO o amb una dosi constant de pazopanib de 0,5 μ g/ml, dosi aproximada a la IC50 (veure Figura R30A). Vam tractar les cèl·lules durant 4 dies, i al final del tractament vam analitzar la viabilitat cel·lular mesurant la incorporació de MTT. El tractament amb pazopanib feia ambdues línies més sensibles a CDDP (Figura R36), encara que l'efecte causat en les GCT27R era molt més elevat i s'obtenia una corba més propera a les cèl·lules sensibles que a les resistents. En l'anàlisi de les IC50s s'obtenien valors molt propers entre les corbes GCT27S i les GCT27R-pazopanib; i la diferència entre els valors d'IC50s de les corbes de GCT27R control o tractades amb pazopanib era estadísticament significativa (Taula R5).

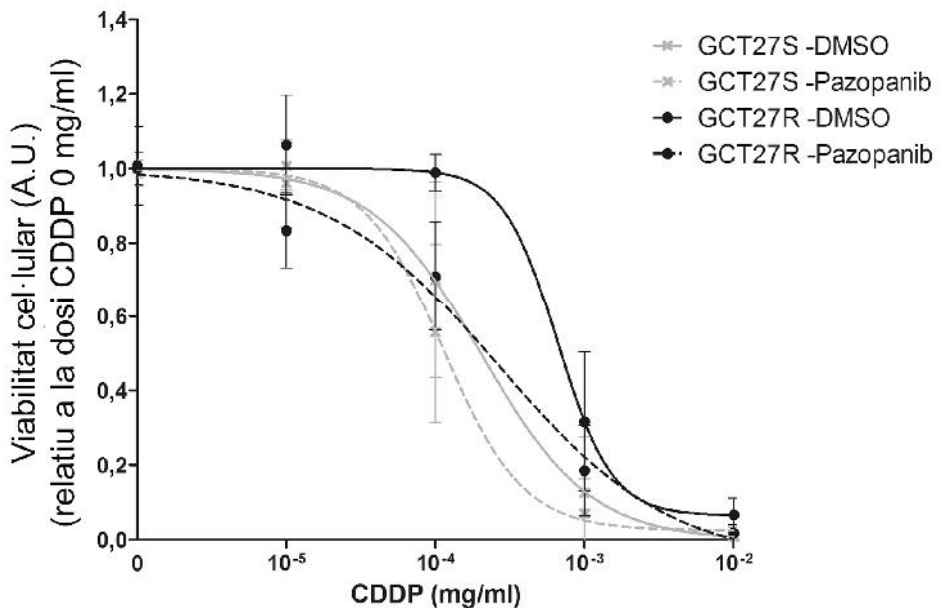


Figura R36. Pazopanib sensibilitza les GCT27 a l'efecte de CDDP. Les GCT27S i les GCT27R es van tractar amb diferents dosis de CDDP, de 0 a 0,01 mg/ml, en presència de DMSO o de 0,5 μ g/ml de pazopanib. Al cap de 4 dies de tractament es va analitzar la viabilitat cel·lular en un assaig MTT. Els resultats mostrats, en unitats arbitràries (U.A.) són les mitjanes en cada punt de sis experiments independents. L'error mostrat en cada punt del gràfic és la DE.

	IC50	DE	Valors de p		
			a GCT27S DMSO	a GCT27S Pazo.	a GCT27R DMSO
GCT27S +DMSO	2,81E-04	± 1,42E-04			
GCT27S +Pazo.	1,63E-04	± 6,50E-05	0,485		
GCT27R +DMSO	7,20E-04	± 3,42E-04	0,041	0,009	
GCT27R +Pazo.	2,56E-04	± 1,22E-04	0,937	0,240	0,015

Taula R5. Valors de IC50s en les corbes de CDDP de les GCT27S i GCT27R tractades amb DMSO o pazopanib 0,5 µg/ml. Es mostren els valors de p obtinguts en un test de la U de Mann-Withney.

Pazopanib es un fàrmac que a més a més de PDGFR β presenta una especificitat elevada per PDGFR α i c-KIT, entre d'altres (Kumar et al., 2007). Per tal d'estudiar si la resensibilització de les GCT27R amb el tractament amb pazopanib (Figura R36) podia ser efecte de la inhibició específica de PDGFR β vam generar línies de GCT27R amb l'expressió del receptor inhibida per constructes lentivirals shRNA.

Les GCT27R es van transduïr amb 4 vectors lentivirals amb seqüències shRNA específiques per PDGFR β , i com a control negatiu un vector sense shRNA, *empty vector* (EV). Com a control de sensibilitat a CDDP vam generar també GCT27S-EV, transduïdes amb el vector control EV. Seleccionant amb puromicina les cèl·lules infectades vam aconseguir línies estables per cada un dels virus: GCT27S-EV, GCT27R-EV, GCT27R-shp β 1, GCT27R-shp β 2, GCT27R-shp β 4 i GCT27R-shp β 5.

En primer lloc vam analitzar, per *western blot*, l'expressió dels receptors PDGFR α i PDGFR β en aquestes línies estables generades (Figura R37A). De les quatre línies GCT27R transduïdes i seleccionades pels virus PDGFR β -shRNA tant sols una, la GCT27R-shP β 4, presentava nivells d'expressió menors, i encara que no era una inhibició total, sí que mostrava nivells molt semblants a la GCT27S-EV. Els nivells de PDGFR α no variaven de manera significativa. Vam seleccionar doncs la GCT27R-shP β 4 per estudiar la resposta a CDDP. Es van tractar les GCT27S, les GCT27R i les GCT27R-shP β 4 durant quatre dies amb diferents dosis de CDDP i la viabilitat cel·lular al final del tractament es va mesurar mitjançant un assaig MTT (Figura R37B). Els resultats de les corbes mostraven una major sensibilitat a CDDP de les GCT27R-shP β 4 respecte les GCT27R; encara que les IC50s tenien valors molt semblants, les diferències de viabilitat cel·lular a la dosi de 0,1 µg/ml de CDDP de les GCT27R-shP β 4 i les GCT27S respecte les GCT27R eren significatives en un test de la U de Mann-Whitney. Així doncs els valors de viabilitat cel·lular, respectiva a la condició de CDDP 0 mg/ml, eren de 0,97

per les GCT27R, 0,75 per les GCT27R-shPβ4, i de 0,38 per les GCT27S.

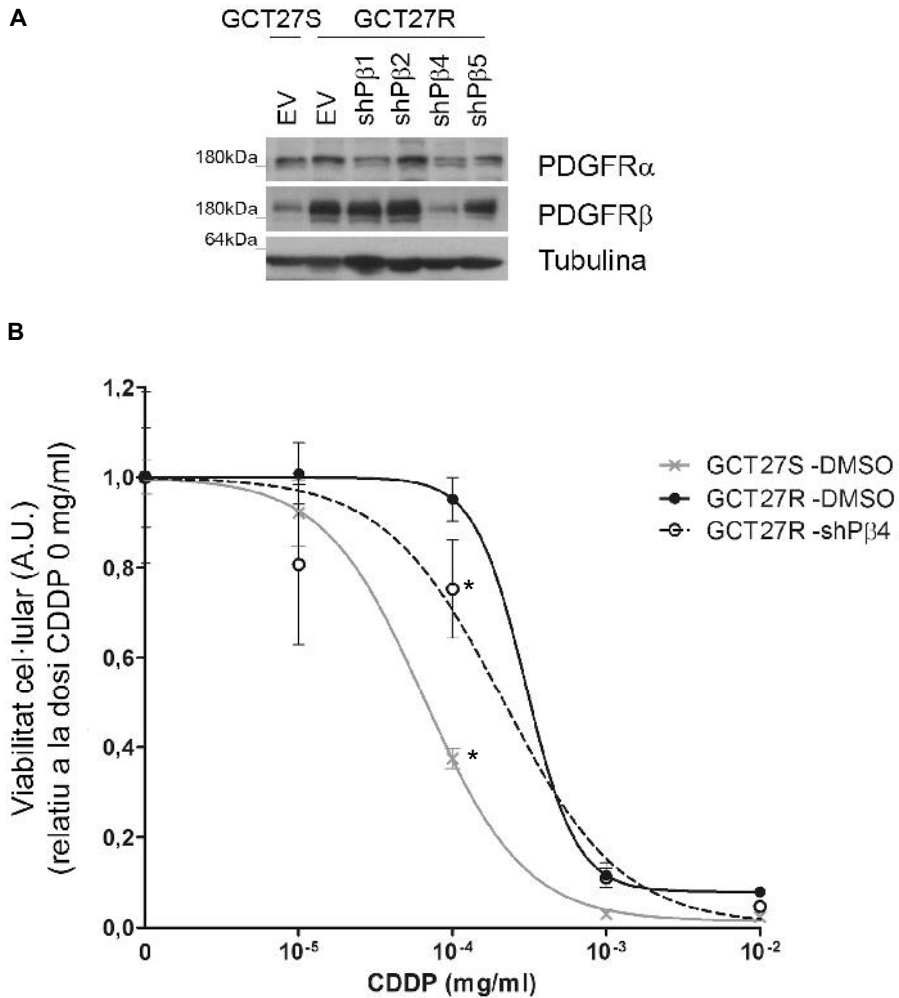


Figura R37. La inhibició específica de PDGFRβ no afecta la resistència a CDDP de les GCT27R. Es van generar línies GCT27estables transduint amb vectors lentivirals amb seqüències shRNAs específiques per PDGFRβ (shPβs), o línies GCT27S i GCT27R control amb constructes buits, *empty vector* (EV). A) L'expressió de PDGFRα i PDGFRβ es va analitzar per *western blot* en aquestes línies estables generades. La tubulina es va analitzar com a control de càrrega. B) Es va analitzar la sensibilitat a CDDP mitjançant una corba dosi resposta de les GCT27S, GCT27R i de les GCT27R-shPβ4. Les quatre línies es van tractar durant 4 dies amb diferents dosis de CDDP, de 0 a 0,01 mg/ml, i al finalitzar el tractament es va analitzar la viabilitat cel·lular mesurant la incorporació de MTT. Es mostra la mitjana, en unitats arbitràries (U.A.) d'aquests valors ± DE. Els valors de viabilitat cel·lular, respectiva a la condició de CDDP 0 mg/ml, eren de 0,97 per les GCT27R, 0,75 per les GCT27R-shPβ4, i de 0,38 per les GCT27S. * p<0,05 dels valors de viabilitat cel·lular a 0,1 µg/ml de CDDP respecte GCT27R-DMSO, en un test de la U de Mann-Withney U.

A continuació vam voler analitzar els nivells d'activitat d'AKT en les cèl·lules on havíem bloquejat l'expressió de PDGFR β parcialment. Vam poder observar que les GCT27R-shP β 4 presentaven una disminució dels nivells d'expressió de PDGFR β de 3,3 vegades respecte les GCT27R, i que aquests nivells eren equivalents als de les GCT27S. La baixada d'expressió de PDGFR β va provocar una disminució dels nivells de pAKT d'1,6 vegades en les GCT27R-shP β 4 respecte les GCT27R, en aquest cas però els nivells de pAKT no eren equivalents als presentats per les GCT27S, sinó que les GCT27R-shP β 4 encara expressaven 10 vegades més pAKT (Figura R38A). Els nivells d'AKT total no variaven entre les línies, així com tampoc ho feien els nivells d'ERK1/2, ni la seva forma activa pERK1/2.

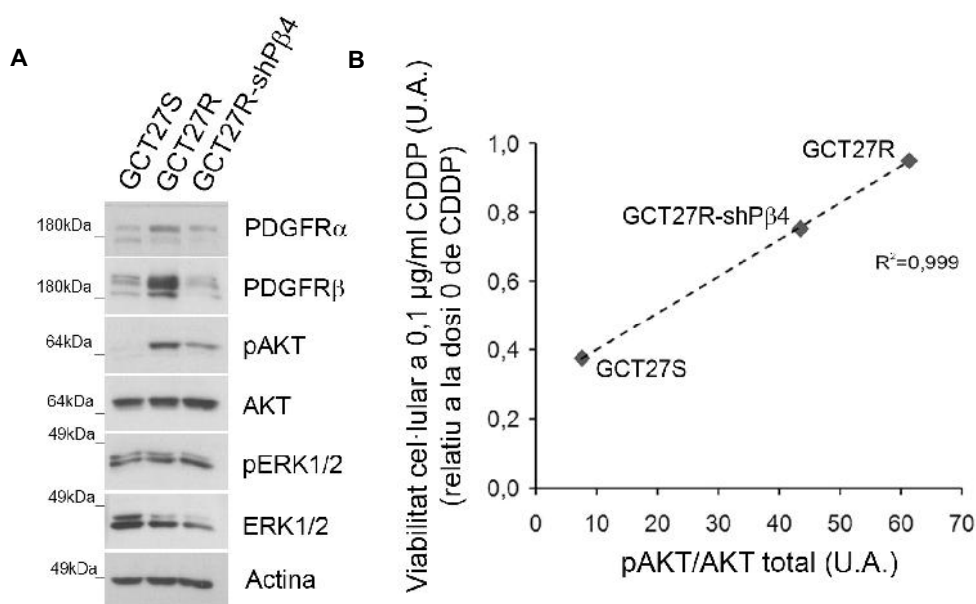


Figura R38. La resposta a CDDP correlaciona amb els nivells d'AKT actius en les cèl·lules GCT27. A) Es van analitzar per *western blot* els nivells d'expressió de PDGFR α , PDGFR β , pAKT, AKT, pERK1/2, ERK1/2 i l'actina com a control de càrrega, en les GCT27S, GCT27R i les GCT27R-shP β 4. B) La viabilitat cel·lular de les GCT27S, GCT27R i les GCT27R-shP β 4 a 0,1 μ g/ml de CDDP (Fig. R37B) correlaciona directament amb els nivells d'AKT actius, quantificats densitomètricament del *western blot* (A) relativitzant els nivells de pAKT pels d'AKT total, en unitats arbitràries (U.A.).

Vam voler identificar si hi havia una correlació entre els nivells actius d'AKT i la resposta a CDDP de les GCT27S, GCT27R i les GCT27R-shP β 4. Per densitometria vam quantificar els nivells d'activació d'AKT en cada una de les línies, relativitzant els nivells d'expressió de la cinasa fosforilada respecte els nivells expressió d'AKT total obtinguts

en el *western blot* anterior (Figura R38A). Els nivells d'activació d'AKT es va representar respecte la viabilitat cel·lular mostrada a la dosi de 0,1 µg/ml de CDDP en la corba de la Figura R37B, dosi on la diferència de resposta a CDDP entre les cèl·lules sensibles i resistents era màxima. Els resultats obtinguts mostraven una correlació directa molt forta, amb un coeficient de correlació del 0,999, entre els nivells d'activitat AKT i la resposta a CDDP en les GCT27 (Figura R38B).

També vam observar com el tractament amb l'inhibidor de l'activitat AKT Ly294002 sensibilitzava les GCT27R, presentant nivells de resposta de CDDP semblants al de les cèl·lules GCT27S. De manera que tractant les cèl·lules resistents amb Ly294002 5 µM mostraven una sensibilitat a CDDP molt semblant a la sensibilitat de les GCT27S, i a dosis més elevades de Ly294002, a 15 µM, la resposta a CDDP de les GCT27R no presentava diferències significatives amb la resposta de les cèl·lules sensibles en les mateixes condicions de CDDP i Ly294002 (Figura R39).

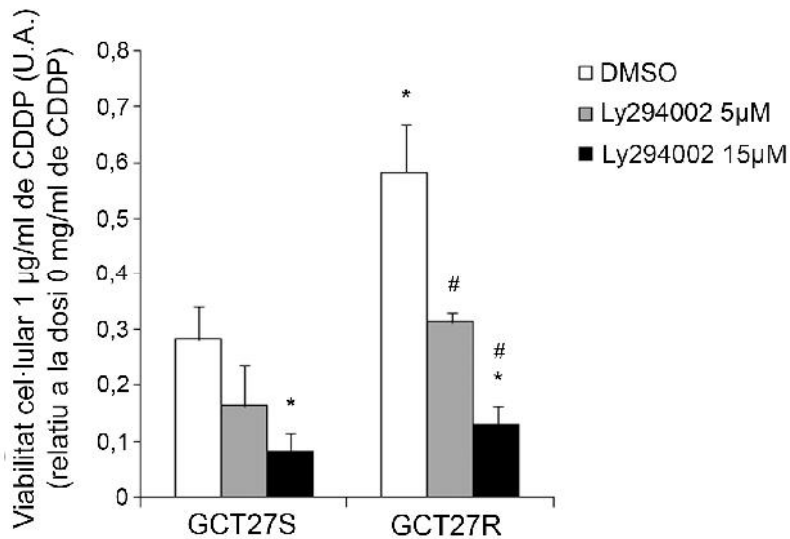


Figura R39. La inhibició de l'activitat d'AKT, amb Ly294002, sensibilitza les GCT27R davant el tractament de CDDP. Les GCT27S i les GCT27R es van tractar durant 4 dies en absència i presència d'1 µg/ml de CDDP, i amb el tractament addicional de l'inhibidor de PI3K a 5 µM, 15 µM, o absència (DMSO). La viabilitat cel·lular al finalitzar el tractament es va analitzar amb l'assaig MTT. Els resultats s'expressen relativitzats a la condició de creixement sense CDDP per cada línia cel·lular. Cada valor es representa segons la mitjana en unitats arbitràries (U.A.) ± DE. * $p < 0,05$ respecte el punt DMSO de les GCT27S; # $p < 0,05$ respecte el punt DMSO de les GCT27R, en un test de la U de Mann-Whitney.

Així doncs els nivells d'activació d'AKT correlacionaven directament amb la resposta a CDDP i la seva inhibició atenuava les diferències de sensibilitat a CDDP entre les dues línies cel·lulars, GCT27S i GCT27R.

Tots aquests resultats indicaven l'activació del *loop* autocrí PDGF-BB/PDGFR β /AKT com a mecanisme de resistència adquirida a CDDP en la línia cel·lular de TGTs, GCT27R.

2.4 Expressió de PDGFR β en pacients humans de TGTs

Els resultats descrits fins al moment mostraven una sobreexpressió de PDGFR β en els fenotips resistents de dues parelles de línies cel·lulars amb sensibilitat-resistència a CDDP. Vam voler ampliar aquest estudi en els tumors testiculars ortotòpics, originals de pacients humans i implantats en ratolins atímics.

2.4.1 Els receptors PDGFRs es troben sobreexpressats en models ortotòpics de TGTs resistents a CDDP

Amb aquest objectiu vam agrupar quatre tumors testiculars ortotòpics segons els seus components histològics, creant dues parelles de tumors sensibles i resistents a CDDP.

En primer lloc vam analitzar la parella formada per dos coriocarcinomes, el TGT38 i el TGT38R; que com ja hem comentat anteriorment el TGT38R és el tumor TGT38 amb resistència a CDDP adquirida (Castillo-Avila et al., 2009). Vam analitzar l'expressió de l'mRNA de PDGFR α i PDGFR β en mostres de tumors independents de TGT38 i TGT38R. Es van utilitzar primers específics per els receptors humans, discriminant-los dels murins. Els resultats van mostrar un increment significatiu de 2,2 vegades més de l'expressió de PDGFR β en el tumor resistent respecte el sensible a CDDP. No vam observar diferències en l'expressió de PDGFR α entre els dos tumors (Figura R40A). Aquests resultats es van voler confirmar a nivell de proteïna, i vam analitzar l'expressió de PDGFR β per *western blot* en mostres independents de cada tumor (Figura R40B). A continuació vam quantificar densitomètricament l'expressió del receptor en cada tumor, relativitzant-la a la tubulina de cada mostra. Els resultats de la quantificació van mostrar com efectivament PDGFR β s'expressava 3 vegades més, i de manera significativa, en el

coriocarcinoma ortotòpic amb resistència adquirida respecte el seu tumor parental (Figura R40C).

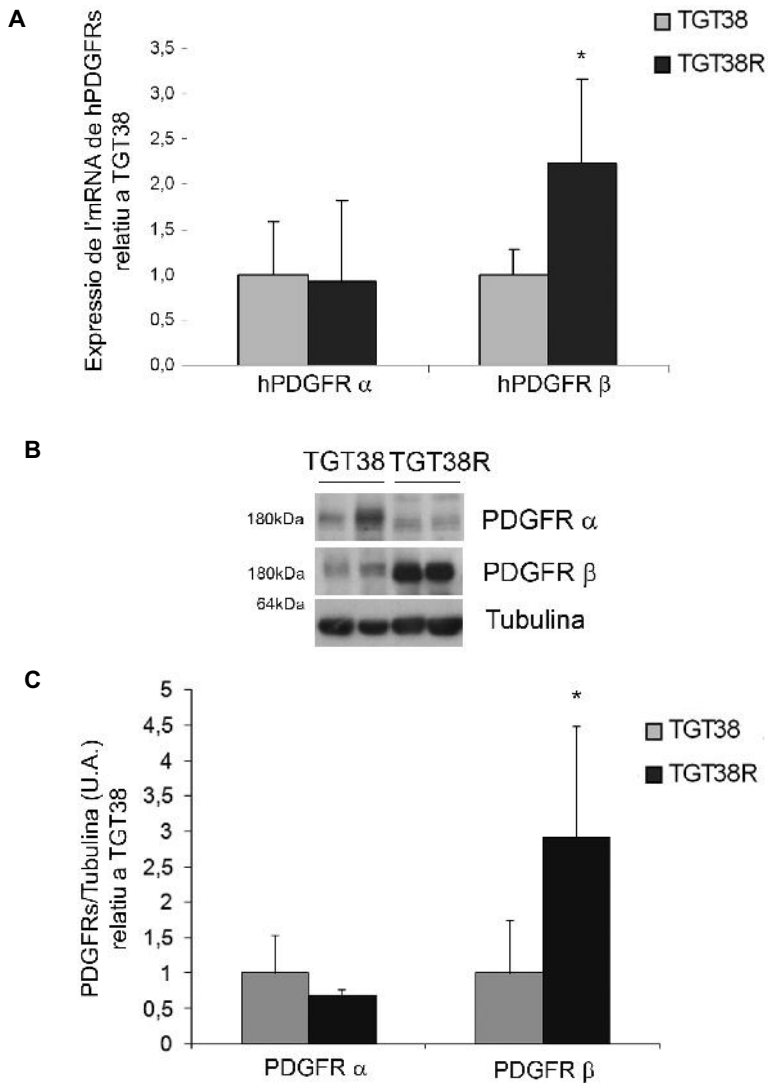


Figura R41. PDGFR β es troba sobreexpressat en un coriocarcinoma ortotòpic amb resistència a CDDP adquirida, el TGT38R, respecte el tumor ortotòpic parental, el TGT38. A) Per RT-PCR es van analitzar els nivells d'expressió de l'mRNA dels PDGFR α i PDGFR β humans en 4 mostres independents de TGT38 i TGT38R. Els resultats s'expressen relativitzats als nivells d'expressió a TGT38 \pm DE. *, $p < 0,05$ en el test estadístic de la U de Mann-Whitney. B) Els nivells de PDGFR α i PDGFR β van ser analitzats per *western blot*, en mostres independents dels tumors TGT38 i TGT38R. Es mostra una imatge representativa de l'anàlisi. C) Per densitometria es va quantificar l'expressió dels dos receptors respecte la tubulina (control de càrrega), obtinguts en els *western blots*. Es van quantificar 5 tumors per el TGT38 i 4 per el TGT38R. Els resultats de la quantificació s'expressen com la mitjana relativitzada als nivells en el TGT38 \pm DE. *, $p < 0,05$ en el test estadístic de la U de Mann-Whitney.

Així doncs reproduïrem els resultats observats en les dues línies cel·lulars, on els fenotips resistents sobreexpressaven PDGFR β . Però aquest cop en mostres de dos tumors ortotòpics aparellats, un coriocarcinoma amb resistència adquirida i el seu parental, on aquest últim té l'origen en un pacient humà.

Continuant en l'anàlisi de l'expressió dels PDGFRs en fenotips sensibles i resistents a CDDP, vam voler fer-ho en el TGT44, el tumor ortotòpic originari d'una metàstasi retroperitoneal refractària a la primera línia de CDDP, i que mantenia aquesta resistència en el model animal (Figura R27). Al provenir directament de pacient, i no ser un tumor amb resistència adquirida el qual es pot comparar fàcilment amb el seu tumor parental, vam aparellar-lo segons component histològic. Ja que el TGT44 era un carcinoma de sac vitel·lí (Figura R27) vam aparellar-lo amb el TGT1, un carcinoma també de sac vitel·lí, i que en el grup d'investigació ja havíem descrit la seva sensibilitat a CDDP (Castillo-Avila et al., 2009).

Tal com havíem fet en la parella de coriocarcinomes vam analitzar en primer lloc l'expressió de l'mRNA dels receptors per RT-PCR. Els resultats obtinguts van ser interessants, ja que en comptes d'observar sobreexpressió del PDGFR β , vam observar un augment de 27 vegades els nivells d'expressió de PDGFR α en el tumor resistent a CDDP (Figura R41A). A continuació vam analitzar l'expressió dels receptors però a nivell de proteïna, per *western blot* (Figura R41B), i vam quantificar-la densitòmicament relativitzant-la per la tubulina (Figura R41C). Els resultats van confirmar la sobreexpressió de PDGFR α en el TGT44 respecte els nivells d'expressió en el TGT1, i es va observar una expressió de 2,5 vegades més. Per altra banda els nivells de PDGFR β no es veien alterats al comparar ambdós tumors.

En aquesta parella doncs teníem que PDGFR α es trobava sobreexpressat en el tumor resistent, en comptes de PDGFR β . Tot i que era interessant veure com algun dels dos receptors es sobreexpressa en els fenotips resistents, era difícil de dir però si els resultats obtinguts d'aquesta última parella eren rellevants, tenint en compte que aparellar el TGT1 i el TGT44 era com aparellar dos pacients diferents, mentre que el TGT38 i el TGT38R tenien el mateix fons genètic.

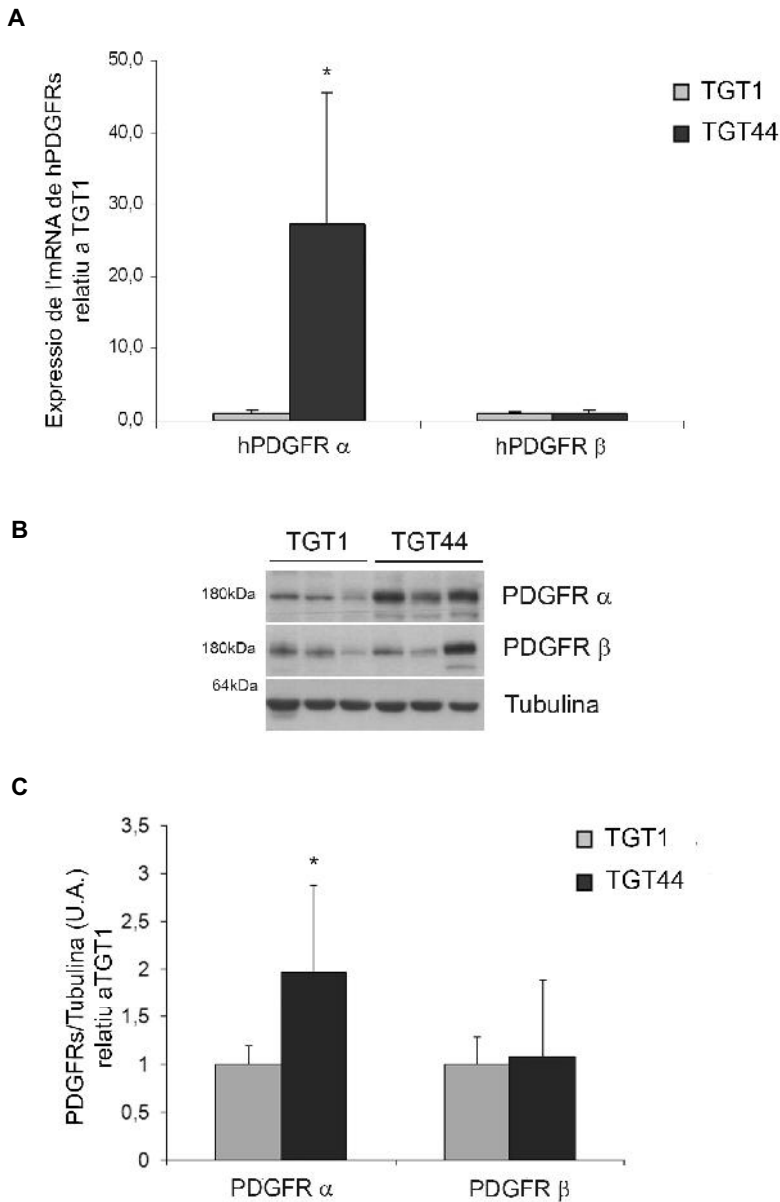


Figura R41. PDGFR α s'expressa en nivells més elevats en el TGT44 respecte el TGT1.

A) Per RT-PCR es van analitzar els nivells d'expressió de l'mRNA dels PDGFR α i PDGFR β humans en 4 mostres independents de TGT1 i TGT44. Els resultats s'expressen relativitzats als nivells d'expressió a TGT1 \pm DE. *, $p < 0,05$ en el test estadístic de la U de Mann-Withney. B) Els nivells de PDGFR α i PDGFR β van ser analitzats per *western blot*, en mostres independents dels tumors TGT1 i TGT44. Es mostra una imatge representativa de l'anàlisi. C) Per densitometria es va quantificar l'expressió dels dos receptors respecte la tubulina (control de càrrega), obtinguda en els *western blots*. Es van quantificar 5 tumors per el TGT1 i 4 per el TGT44. Els resultats de la quantificació s'expressa la mitjana relativitzada als nivells en el TGT1 \pm DE. *, $p < 0,05$ en el test estadístic de la U de Mann-Withney.

Ja per acabar vam preguntar-nos si l'expressió dels lligands PDGF-A o PDGF-B podia ser diferent entre el fenotip sensible i el resistent, tal com havíem observat en les cèl·lules. Per això vam analitzar l'expressió de PDGF-A i PDGF-B humans en les dues parelles de tumors testiculars ortotòpics. Els resultats van ser negatius, i no vam observar diferències d'expressió entre el TGT38 i el TGT38R (Figura R42A), i el TGT1 i el TGT44 (Figura R42B).

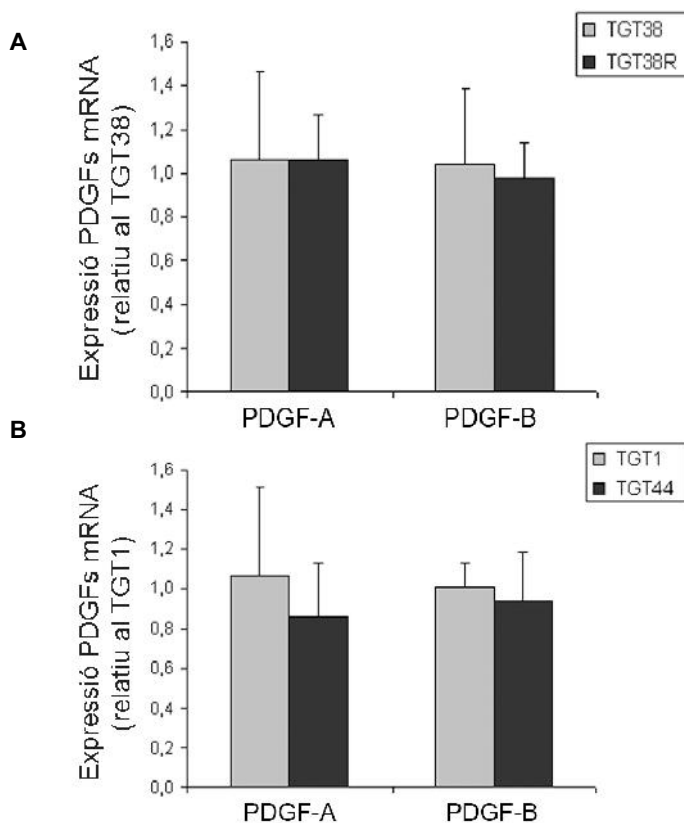


Figura R42. Els nivells d'expressió de mRNA de PDGF-A i PDGF-B no varien entre les parelles de tumors sensibles-resistents a CDDP. Per RT-PCR es van analitzar els nivells d'expressió dels mRNAs humans de PDGF-A i PDGF-B en la parella de tumors TGT38-TGT38R (A) i TGT1-TGT44 (B). Els resultats s'expressen relativitzats als nivells d'expressió del fenotip sensible en cada parella \pm DE.

2.4.2 Expressió de PDGFR β en pacients de TGTs no seminomatosos

Fins al moment havíem observat sobreexpressió de PDGFR β en els fenotips resistents a CDDP respecte els sensibles de dues línies cel·lulars, de component de carcinoma embrionari i/o teratoma, i per altra banda en una parella de coriocarcinomes ortotòpics. Podia ser doncs que els pacients resistents a CDDP tinguessin també una expressió més elevada de PDGFR β que els sensibles.

Per estudiar doncs l'expressió del receptor en mostres de pacients de diferent sensibilitat a CDDP i diversos components histològics vam realitzar, en col·laboració amb el Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge i amb el Dr. August Vidal, la immunotinció del *tissue micro array* (TMA) de tumors testiculars per PDGFR β .

El TMA és una col·lecció de mostres provinents de 96 pacients de TGTs, de diferents components histològics i també diferent sensibilitat a CDDP: 73 dels pacients van presentar sensibilitat a CDDP i els 23 restants resistència. Per tant era una bona eina per analitzar l'expressió de PDGFR β en pacients humans de diferent pronòstic clínic, component histològic i sensibilitat a CDDP. Cal dir però que existeix un biaix en aquestes mostres ja que engloben els pacients tractats amb CDDP, on un elevat percentatge són metastàtics, i que per tant en el moment del diagnòstic ja presentaven un fenotip més agressiu, amb invasió vascular; quedant descartats doncs els pacients amb millor prognosi que no es tracten amb CDDP.

Els 8 porta-objectes que componen tot el TMA es van tenyir immunohistoquímicament per PDGFR β , i posteriorment es va analitzar l'expressió de PDGFR β en cada mostra. L'anàlisi es va realitzar quantificant tres paràmetres: intensitat d'expressió, percentatge de cèl·lules tumorals marcades i localització de l'expressió del receptor en la cèl·lula tumoral, si era a citoplasma o a membrana. La intensitat d'expressió es va quantificar segons dos nivells d'expressió: intensitat de grau 1 que era una intensitat nula o molt baixa i suau; i la intensitat de grau 2 que es componia per la intensitat d'expressió mitjana i elevada. En la Figura R43 es mostren exemples d'imatges amb diferents graus d'intensitat en carcinoma embrionari i coriocarcinoma. No es mostren imatges d'expressió nul·la ja que no es va trobar cap tumor amb aquestes característiques.

L'anàlisi es va realitzar en mostres de TGTs no seminomatosos ja que tenen pitjor pronòstic que els seminomes, i es van descartar també els teratomes degut a la seva

falta de resposta a CDDP, i que per tant no es podia parlar de sensibilitat/resistència al quimioterapèutic. Cada una de les mostres analitzades es trobava per triplicat, i en el cas de tenir diferents valoracions de l'expressió de PDGFR β sempre es va adoptar l'expressió final més elevada de les tres rèpliques.

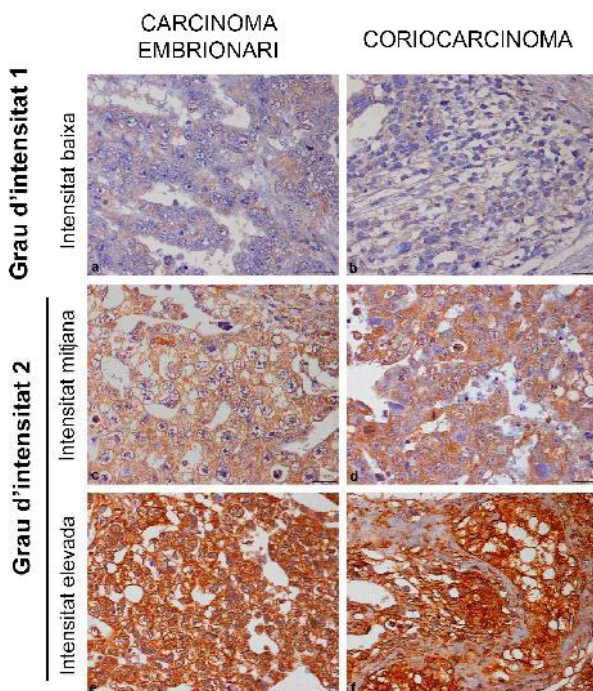


Figura R43. Expressió de PDGFR β en les mostres de tumors testiculars del *tissue macro array* (TMA). Es va realitzar una immunotinció de PDGFR β en les mostres del TMA de tumors testiculars. Es van obtenir imatges representatives dels graus d'intensitat d'expressió de PDGFR β 1 i 2. On el grau d'intensitat 1 era una expressió nula o amb intensitat baixa (a-b); i el grau d'intensitat 2 era una expressió d'intensitat mitjana (c-d) i intensitat elevada (e-f), en carcinomes embrionaris (a,c i e) i coriocarcinomes (b, d i f). 400x escala 25 μ m.

Dels resultats obtinguts el primer que cal destacar és que no es va obtenir cap mostra de tumor amb intensitat nul·la, i que el 74% de totes les mostres de tumors testiculars analitzades presentaven intensitat mitjana-elevada, i només un 26% presentava baixa expressió del receptor. Tot i així, al comparar l'expressió de PDGFR β en les mostres dels pacients sensibles a CDDP amb les mostres dels pacients que havien presentat resistència o refractarietat al quimioterapèutic, no vam observar cap diferència. De les 35 mostres de pacients sensibles analitzades el 71,4% presentaven nivells d'expressió mitjana-elevada, mentre que en els pacients resistents, un total de 18, el 77,8%

mostraven aquesta expressió mitjana-elevada (Figura R44A). Així doncs no observàvem una sobreexpressió de PDGFR β en els tumors resistents, però sí que observàvem una expressió elevada en el conjunt dels tumors testiculars. Cal dir també, i com es pot apreciar a les imatges representatives (Figura R43) que el percentatge de tinció de les cèl·lules tumorals era elevat (més del 65%) en tots els casos d'intensitat mitjana-elevada. Per contra els tumors que presentaven una intensitat baixa generalment el percentatge de cèl·lules tumorals marcades disminuïa per sota del 50%.

Vam analitzar també les mostres segons el component histològic, de manera que tan sols vam avaluar l'expressió de PDGFR β en les mostres que presentaven un component concret. Degut als resultats obtinguts amb anterioritat ens vam centrar en els tumors que presentaven carcinoma embrionari i coriocarcinoma, cal dir però que els tumors de sac vitel·lí també es van analitzar i no es va observar cap diferència entre sensibles i resistents a CDDP. 34 dels pacients presentaven carcinoma embrionari, 28 dels quals van mostrar sensibilitat a CDDP i 6 resistència. Quan vam analitzar aquestes mostres vam observar que la proporció de tumors amb intensitat d'expressió de PDGFR β mitjana-elevada es mantenia elevat però no variava entre el grup sensible i resistent a CDDP (Figura R44B). A l'avaluar però els pacients amb component coriocarcinoma vam observar com en el grup de pacients sensibles a CDDP, el 80% presentaven nivells d'expressió de PDGFR β mitjans-elevats, mentre que en el grup dels pacients resistents a CDDP aquesta proporció era del 100% (Figura R44C). Tot i existir una diferència molt marcada els resultats no eren significatius estadísticament, probablement degut a que era un grup amb un nombre de pacients molt reduït: 10 pacients van mostrar sensibilitat al CDDP i 6 resistència. Tot i així es confirmaven els resultats obtinguts en el tumor de coriocarcinoma ortotòpic TGT38, on la seva parella amb resistència adquirida presentava nivells d'expressió de PDGFR β més elevats.

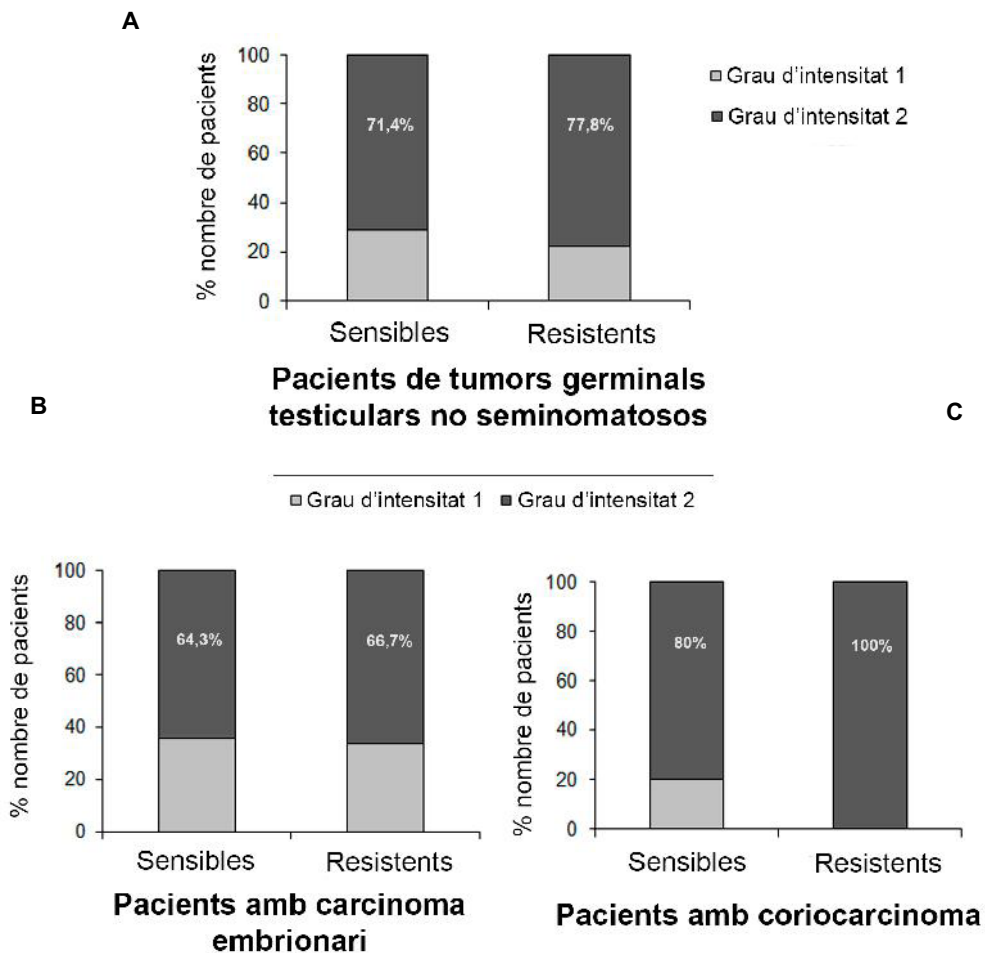


Figura R44. Els tumors testiculars expressen elevats nivells de PDGFR β , sense mostrar masses diferències entre el grup dels sensibles i resistents a CDDP, excepte els coriocarcinomes. A) Es van analitzar els nivells d'expressió de PDGFR β en les mostres del TMA de tumors testiculars: el 71,4% dels pacients sensibles a CDDP (35 pacients) presentaven grau d'intensitat 2 d'expressió del receptor, i dels 18 pacients resistents, el 77,8% expressaven aquest grau 2 d'intensitat. Es van analitzar les mostres segons els components histològics: B) En els pacients amb carcinoma embrionari sensibles a CDDP, 28 en total, el 64,3% expressaven el receptor amb grau d'intensitat 2, i en el grup resistent, compost per 6 pacients, el 66,7% de pacients expressaven nivells d'expressió amb grau d'intensitat 2; C) El 80% dels pacients amb coriocarcinoma sensible a CDDP, un total de 10, presentaven nivells d'expressió amb grau d'intensitat 2, mentre que en el grup resistent, 6 pacients, tots ells presentaven aquests nivells.

DISCUSSIÓ

1. TERÀPIES DIRIGIDES A RECEPTORS ERBBS

I. La senyalització del dímer ErbB2/ErbB3 aporta resistència a les teràpies dirigides contra ErbB1

Aquest estudi partia dels resultats negatius del tractament amb gefitinib i cetuximab en el model de tumor ortotòpic de coriocarcinoma pur TGT38. Tot i els nivells elevats d'expressió d'ErbB1 respecte altres tumors testiculars ambdós tractaments van fracassar en inhibir el creixement tumoral. Els nostres resultats van descartar que aquesta falta d'activitat antitumoral fos deguda a una mala activitat dels inhibidors utilitzats al confirmar la inhibició de pErbB1, presentant així una situació de resistència *de novo* a les teràpies dirigides anti-ErbB1.

Tot i que ErbB1 es troba sobreexpressat en diversos tumors, no s'està obtenint la resposta clínica esperada als tractaments anti-ErbB1 degut a l'aparició de resistències, ja siguin *de novo* o resistències adquirides durant el tractament (Wheeler et al., 2010). S'han descrit i relacionat diverses mutacions en ErbB1 amb la resistència a la seva inhibició (Klein and Levitzki, 2009; Montagut et al., 2012; Sok et al., 2006), però de moment encara cap pot predir la resposta clínica a aquestes teràpies (Wheeler et al., 2010). Els tractaments amb cetuximab i amb gefitinib en el TGT38 no van alterar les vies PI3K/AKT, ERK1/2 i STAT3 i aquestes es van mantenir actives. El manteniment actiu d'aquestes vies o la seva reactivació és un dels mecanismes que generen resistència *de novo* o resistència adquirida a les teràpies anti-ErbB1 (Vlacich and Coffey, 2011).

Existeixen diversos mecanismes per activar aquestes vies de senyalització, o bé per alteració en l'activació de receptors o bé per la desregulació de les pròpies vies de senyalització. És així que desregulacions en la pròpia via de PI3K/PTEN/AKT s'han vist implicades en resistències a teràpies anti-ErbBs; com la deficiència de PTEN o mutacions que activen constitutivament el gen PIK3 (Nagata et al., 2004; Eichhorn et al., 2008; Junttila et al., 2009). De fet l'anàlisi doble de PTEN i de PIK3CA augmenta la detecció de pacients de tumor de mama amb risc de progressió després del tractament amb trastuzumab (Berns et al., 2007).

Per altra banda l'activació d'aquestes vies pot venir donada per la senyalització a través d'altres receptors, que poden ser de la mateixa família dels ErbBs o no. En aquest últim cas MET, és capaç de senyalitzar a PI3K/AKT a través d'ErbB3, *bypassejant* així l'efecte de gefitinib en cèl·lules de tumor de pulmó (Bean et al., 2007; Engelman et al., 2007). L'activació de KRAS o d'IGF-IR també s'han associat a mala resposta a tractaments anti-ErbB1 o resistència a trastuzumab respectivament (Amado et al., 2008; Lu et al., 2004; Oliveras-Ferreros et al., 2010; Pao et al., 2005).

En aquest estudi hem observat una activitat d'ErbB2 independent d'ErbB1, al veure inhibició d'ErbB2 amb lapatinib però no amb cetuximab ni amb gefitinib. La conformació extracel·lular d'ErbB2 l'impedeix unir-se a lligand, però per l'altra banda fa que sigui el receptor preferit pels altres alhora d'heterodimeritzar (Graus-Porta et al., 1997; Hynes and Lane, 2005). Vam confirmar que ErbB2 heterodimeritzava amb ErbB3 quan vam detectar ErbB3 en l'immunoprecipitat d'ErbB2 en lisats de TGT38; i a l'observar el bloqueig indirecte d'ErbB3 en el tractament amb lapatinib, a diferència de l'activitat del receptor observada en els tractaments amb gefitinib i cetuximab.

Altres estudis han mostrat l'activitat d'ErbB3 dependent d'ErbB2, així com també la dependència a la formació d'aquest heterodímer de les vies de senyalització efectores d'aquests receptors (Basso et al., 2002; Cook et al., 2011; Neve et al., 2000). Malgrat la falta d'activitat cinasa innata d'ErbB3 i la falta d'unió a lligand d'ErbB2, el dímer que formen ambdós receptors està considerat el dímer més actiu dins la família dels ErbBs (Baselga and Swain, 2009), i és crucial en la senyalització de molts tumors, sobretot els que presenten amplifació d'ErbB2. Holbro *et al.* ja van descriure el dímer ErbB2/ErbB3 com a una unitat oncogènica en tumors de mama, i van demostrar que la inhibició independent d'ambdós receptors afectava de la mateixa manera a la proliferació de les línies cel·lulars que sobreexpressaven ErbB2, inhibint les vies de senyalització PI3K/AKT i ERK1/2 (Holbro et al., 2003).

El tractament amb lapatinib però, no només bloquejava l'activació d'ErbB2 i ErbB3, sinó que també bloquejava el creixement tumoral del TGT38 un 50% i inhibia les vies de senyalització AKT, ERK1/2 i STAT3. Aquests resultats indicaven que el dímer ErbB2/ErbB3 era actiu en el TGT38, que participava en el creixement tumoral d'aquest model, i que la seva senyalització conferia resistència a les teràpies dirigides a ErbB1 observades en els resultats inicials de l'estudi.

La implicació de la senyalització d'ErbB2 i ErbB3, activant la via de PI3K, com a mecanisme de resistència a gefitinib o erlotinib s'ha descrit en diverses ocasions en cèl·lules de tumors de cap i coll o NSCLC (Engelman et al., 2005; Erjala et al., 2006; Sergina et al., 2007; Tabara et al., 2012). S'ha descrit també com a mecanisme de resistència a cetuximab la senyalització via ErbB2 activant ERK1/2, ja sigui per amplifacació del receptor o dimeritzant amb ErbB3; resultats que han estat corroborats en mostres de pacients de càncer colorectal (Bertotti et al., 2011; Yonesaka et al., 2011).

També hi ha evidències de que la senyalització dels receptors ErbBs pot aportar resistència a les teràpies dirigides a altres receptors de la família, i no només a ErbB1. Així per exemple s'ha descrit que la sobreexpressió d'ErbB1 i els seus lligands aporta resistència a trastuzumab en tumors de mama ErbB2 positius (Ritter et al., 2007). O que la mateixa conformació dels dímers dels receptors actius pot provocar resistència a tractaments. Pertuzumab per exemple és capaç de bloquejar la formació del dímer ErbB2/ErbB3 en presència de lligand, mentre que trastuzumab no pot. En canvi aquest últim dissocia el dímer quan aquest s'activa de manera independent de lligand (Junttila et al., 2009).

Hem demostrat la presència del dímer actiu ErbB2/ErbB3 però només en un model tumoral, el TGT38. Tot i així hem observat com en una sèrie de vuit tumors ortotòpics testiculars de diferents components histològics, l'expressió d'ErbB2 i ErbB3 segueix un mateix patró. Això passa en altres tumors (Alimandi et al., 1995; Chow et al., 2001), suggerint que molt probablement ambdós receptors també senyalitzen junts en aquests altres tumors.

II. Paper d'ErbB3 en TGTs

Altres estudis havien implicat en menor o major mesura els receptors ErbB1 i ErbB2 en la tumorigènesi dels tumors germinals testiculars, però el nostre estudi aporta indicis d'un paper també d'ErbB3 en la tumorigènesi dels TGTs.

ErbB3 ja fa temps que s'ha descrit amb activitat oncogènica en diversos tumors com pròstata (Gregory et al., 2005; Mellinghoff et al., 2004), pulmó (Engelman et al., 2005; Engelman et al., 2007), mama (Vaught et al., 2012) o ovari (Sheng et al., 2010; Tanner

et al., 2006). I recentment s'ha descrit que ErbB3 s'expressa en un 8% de tumors colorectals amb mutacions oncogèniques (Seshagiri et al., 2012). Actualment ja s'estan desenvolupant fàrmacs dirigits a la inhibició d'aquest receptor obtenint resultats positius preclínic (Auricchio et al., 2012; McDonagh et al., 2012; Schoeberl et al., 2010), i algú d'ells ja s'està avaluant en assaig clínic per al tractament de tumors de mama ErbB2+ combinat amb trastuzumab, lapatinib o quimioterapèutics (Clinicaltrials.gov, 2013 -b; Clinicaltrials.gov, 2013 -d).

Recentment Vaught *et al.* han demostrat que l'expressió d'ErbB3 és necessària per generar hiperplàsies dirigides per ErbB2 en epitelis de mama. A més a més, la supressió de l'expressió d'ErbB3, un cop ja s'han format els tumors, inhibeix l'activitat d'AKT i sensibilitza els tumors al tractament amb lapatinib (Vaught et al., 2012). Un altre estudi també demostra com la inhibició genètica d'ErbB3, en aquest cas per shRNAs induïbles, inhibeix el creixement tumoral *in vivo*. A més a més descriuen un *loop* autocrí essencial en la proliferació de cèl·lules tumorals d'ovari que involucra l'activació d'ErbB3 i el seu lligand NRG1; present també en mostres de pacients humans i que suggereixen com a possible biomarcador (Sheng et al., 2010).

De manera semblant a aquests estudis, nosaltres hem inhibit l'expressió d'ErbB3 en les línies de tumor testicular SuSa i GCT27, i hem observat menor viabilitat cel·lular i un creixement més lent tant *in vitro* i *in vivo*, encara que els resultats no tenen massa potència estadística. Podria ser que ErbB3 no jugués un paper tant central en la progressió tumoral d'aquestes línies, o bé que al no realitzar una supressió induïble sinó que permanent, haguem generat una pressió que pot haver permès la compensació parcial de la via inhibida. Tenint en compte doncs que ErbB3 és un activador principal de la via d'AKT, conèixer els nivells d'activació de la via, tant en les cèl·lules parentals com en les transduïdes, així com fer-ne un seguiment al llarg de l'establiment de la línia cel·lular ens hagués pogut ajudar respondre aquesta qüestió.

Els nostres resultats *in vivo* mostren una expressió elevada i generalitzada en els diferents models de TGTs analitzats. En el TGT38 hem mostrat una sobreexpressió del transcript del receptor de fins a 16 vegades més que en els testicles normals, i en tots els models ortotòpics de TGTs analitzats també hi hem detectat expressió d'ErbB3. A més a més hem demostrat que el patró d'expressió del receptor es manté de les mostres primàries als tumors ortotòpics, així com l'expressió dels altres dos receptors analitzats, ErbB1 i ErbB2. Donant així més rellevància als models utilitzats, demostrant

que mantenen característiques presents en els pacients originaris, i per tant que els pacients de TGTs també expressen ErbB3. De fet, ErbB3 juga un paper en el desenvolupament embrionari testicular, i s'expressa en les cèl·lules germinals primordials juntament amb el seu lligand NRG1 β i ErbB2, durant el desenvolupament embrionari de les gònades (Kierszenbaum and Tres, 2001; Toyoda-Ohno et al., 1999). Si l'expressió d'ErbB3 en aquests tumors pot ser conseqüència d'un estat indiferenciat de les cèl·lules tumorals podria ser un aspecte a investigar en un futur.

Així doncs, malgrat que els resultats de la inhibició d'ErbB3 *in vitro* són bastant modestos, el nostre treball és el primer que descriu expressió d'ErbB3 en TGTs, a part d'haver demostrat que ErbB3 forma un heterodímer oncogènic actiu amb ErbB2 en un model de coriocarcinoma ortotòpic, suggerint-li un paper, almenys acompanyant ErbB2 en la progressió tumoral dels TGTs.

III. Inhibició combinada de receptors ErbBs més eficaç que la simple

La família dels ErbBs s'ha convertit en un important punt de mira en la recerca contra el càncer i és per això que existeixen molts inhibidors alguns d'ells ja en clínica, com hem comentat en la introducció. Malgrat tot encara no queda clar com la co-expressió en un mateix tumor de diferents membres dels receptors ErbBs pot afectar a la resposta a aquests fàrmacs. En aquest estudi donem més força a la idea ja existent de que la inhibició múltiple dels receptors afecta més a la viabilitat cel·lular que la inhibició simple, i que per tant la clínica també hauria d'adoptar aquest concepte.

Hem mostrat com lapatinib inhibia el 50% del creixement tumoral en un model de tumor testicular *in vivo*, i com també era efectiu en inhibir la viabilitat cel·lular de quatre línies *in vitro*. Està àmpliament demostrat que lapatinib és efectiu en els tumors de mama que sobreexpressen ErbB2, però per contra i malgrat ser un inhibidor dual, s'ha mostrat que en aquest context l'acció de lapatinib és independent dels nivells d'expressió d'ErbB1 (Zhang et al., 2008). Possiblement sigui perquè en alguns models tumorals, de manera semblant al nostre, el paper d'ErbB2 junt amb ErbB3 pot ser crític per la proliferació, mentre que el d'ErbB1 és prescindible (Lee-Hoeflich et al., 2008).

En l'anàlisi de l'expressió dels receptors en les línies cel·lulars vam observar que la línia que presentava nivells d'expressió d'ErbB2 més baixos era en la que lapatinib era

menys efectiu; i en canvi la línia SuSa, on lapatinib era més efectiu, era la que presentava nivells d'ErbB3 més elevats. Semblava doncs que els nivells elevats d'expressió d'ErbB2 i ErbB3 podien influir en l'efectivitat de lapatinib. No vam trobar relacions entre els nivells d'expressió d'ErbB1 i l'efectivitat de gefitinib.

En aquests anàlisis *in vitro* gefitinib és efectiu en totes les línies cel·lulars però en menor grau que lapatinib. Fins a quin punt aquesta diferència és deguda a una dependència concreta d'un oncogen, o degut al nombre de dianes que inhibeix cada fàrmac? El concepte d'addició oncogènica va ser introduït per Weinstein (Weinstein, 2002), i s'ha demostrat que la inhibició d'una via concreta pot comprometre la viabilitat cel·lular de les cèl·lules tumorals. L'activació dels receptors de la família dels ErbBs contribueix a la malignització tumoral; i com hem vist es troben alterats en molts tumors (Hynes and Lane, 2005). Malgrat tot s'ha de tenir en compte que durant el desenvolupament tumoral es van acumulant mutacions que contribueixen al procés de malignització tumoral, i que les vies de senyalització poden ser adaptables i redundants. És cert que hi ha alteracions que contribueixen en major grau al procés tumorigènic i que es troben en una freqüència més elevada, però la inhibició combinada de diverses vies de senyalització exercirà més pressió i serà més efectiva que la inhibició simple d'una via, sempre que siguin vies clau en el procés tumorigènic.

Es poden combinar fàrmacs que inhibeixin diverses vies de senyalització, o utilitzar inhibidors multidianes, que inhibeixen simultàniament diferents vies de senyalització. Si és millor una o altra estratègia vindrà determinat sobretot per les dianes i el tumor on es vulgui realitzar el tractament i l'activitat d'aquestes dianes (Broekman et al., 2011). Situant-nos en els inhibidors multidiana: en el camp dels TKIs trobem que hi ha inhibidors que poden inhibir dos receptors de la mateixa família, com lapatinib que inhibeix ErbB1 i ErbB2; o existeixen els inhibidors que bloquegen receptors de famílies diferents i vies diferents, com pazopanib que bloqueja tant els receptors de la família de PDGFRs, o els de VEGFRs.

En el nostre estudi hem observat com la inhibició múltiple de diferents receptors ErbBs és més efectiva alhora de comprometre la viabilitat cel·lular en dues línies de tumors testiculars diferents, les SuSa i les GCT27. Hem observat com el tractament amb lapatinib bloqueja en major grau la viabilitat cel·lular que el tractament amb gefitinib. Per altra banda hem observat també com el tractament amb gefitinib de les línies estables generades shErbB3, totes amb l'expressió del gen ErbB3 *knoquejada*, compromet la

viabilitat cel·lular de manera semblant a la inhibició d'ErbB1 i ErbB2, observat en el tractament amb lapatinib en les línies parentals. Inhibint ErbB3 estariem impeding la formació del dímer ErbB2/ErbB3, aconseguint un efecte semblant a la inhibició d'ErbB2 amb lapatinib (Figura C1).

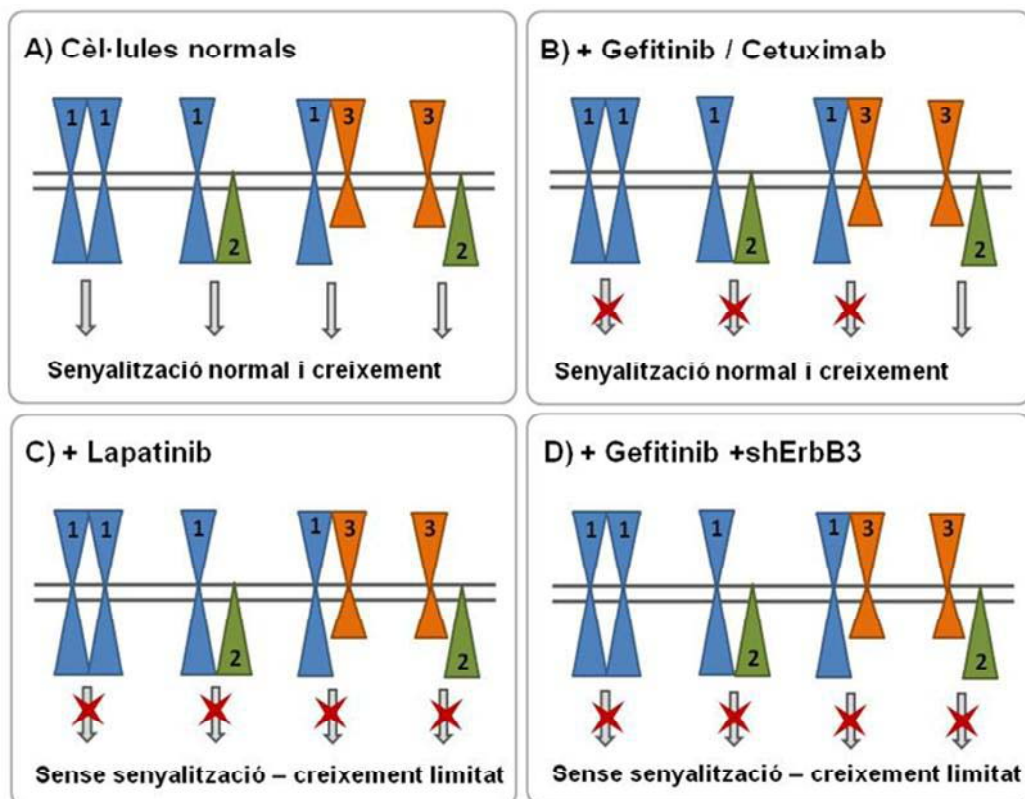


Figura C1. Model de les inhibicions dels receptors ErbBs en les cèl·lules TGTs *in vitro*.

A) En les cèl·lules en situació normal els receptors ErbBs senyalitzen formant els diferents dímers: ErbB1/ErbB1; ErbB1/ErbB2; ErbB1/ErbB3; ErbB3/ErbB3. B) L'administració de gefitinib o cetuximab bloqueja la senyalització dels dímers formats per ErbB1, i per tant tan sols queda actiu el dímer ErbB2/ErbB3. Les cèl·lules no presenten limitacions de creixement C) L'administració de lapatinib bloqueja la senyalització dels dímers formats per ErbB1 i/o ErbB2, bloquejant doncs tots els dímers formats. D) L'administració de gefitinib en cèl·lules shErbB3 (transduïdes amb els vectors lentivirals shRNA per ErbB3) bloqueja els dímers formats per ErbB1 i/o ErbB3, bloquejant també tots els dímers formats. En aquestes dues situacions (C i D) les cèl·lules presenten limitacions en el seu creixement.

El tractament combinat de teràpies dirigides a receptors ErbBs també és efectiu per superar situacions de resistència, com les resistències a cetuximab que es poden *bypassejar* combinant el mateix anticòs monoclonal amb agents anti-ErbB2 o lapatinib, (Bertotti et al., 2011; Quesnelle and Grandis, 2011; Yonesaka et al., 2011) Per altra banda s'ha observat també que en el tractament de cèl·lules resistents a erlotinib, la

inhibició dual d'ErbB1 i ErbB3 amb un sol anticòs monoclonal és més efectiva que la inhibició d'ambdós receptors amb dos anticòs monoclonals individuals (Huang et al., 2013).

Malgrat que els resultats preclínic de les combinacions són contundents, a nivell clínic no està tant clar, i no s'han observat beneficis en la combinació dels tractaments amb trastuzumab i gefitinib, respecte el tractament amb trastuzumab sol, en pacients de tumor de mama metastàtics amb amplifcació d'ErbB2 (Arteaga et al., 2008); sí que s'ha descrit efectivitat del mateix tractament combinatori però administrant també docetaxel (Somlo et al., 2012).

Per altra banda existeixen evidències per fer aproximacions terapèutiques combinant inhibidors dels receptors ErbBs amb la inhibició d'altres vies de senyalització.

Com ja hem comentat, un dels mecanismes de resistència a inhibidors d'ErbBs descrits és l'activació de la via PI3K/AKT (Eichhorn et al., 2008; Nagata et al., 2004), i una de les principals dianes d'AKT respecte progressió tumoral és mTOR, que juga un paper central en el metabolisme cel·lular (Manning and Cantley, 2007). En alguns tumors s'ha observat que l'activació d'AKT, ja sigui per deficiència en PTEN o per hiperactivació d'AKT, resensibilitza els tumors a inhibidors de mTOR (O'Reilly et al., 2006). Així doncs el bloqueig d'ErbB2, amb lapatinib, i de mTOR o de mTOR i AKT alhora, s'ha proposat com a teràpia en càncers de mama que sobreexpressen ErbB2 i són resistents a trastuzumab o lapatinib, obtenint resultats sinèrgics d'ambdós tractaments (Garcia-Garcia et al., 2012; Gayle et al., 2012).

Altres combinacions que s'han proposat són la inhibició d'IGF-1R i la inhibició de receptors ErbB1 i ErbB2 amb axitinib, tractament que té efectes sinèrgics en cèl·lules pancreàtiques (Ioannou et al., 2013). O la combinació de la inhibició del receptor de FGF (FGFR) amb un fàrmac que inhibeix ErbB1 i ErbB2, que ha mostrat tenir efectes antitumorals en models de tumor de mama (Issa et al., 2013).

En aquest estudi mostrem com el tractament combinant lapatinib i pazopanib té un efecte sinèrgic en el tractament del TGT38, aconseguint una inhibició del 88% del creixement del TGT38. Hem observat que lapatinib exercia molt poc efecte sobre la vasculatura tumoral. Cert que s'observava una disminució en l'àrea positiva pel marcador endotelial CD31, però aquesta no era significativa i podríem atribuir-la a la mateixa disminució del volum tumoral, més que a un efecte antiangiogènic directe, ja

que a més a més el nombre de vasos no disminuïa amb aquest tractament. El tractament de pazopanib en canvi, de manera individual o combinat amb lapatinib, sí que provocava una disminució significativa tant de l'àrea positiva per CD31 com del nombre de vasos. Tots aquests resultats mostraven que ambdós fàrmacs tenien dianes i efectes independents que comprometien el creixement del tumor.

Olaussen *et al.*, van demostrar en un estudi *in vitro* que lapatinib i pazopanib tenien efectes sinèrgics a l'induir apoptosi de cèl·lules de pulmó (Olaussen *et al.*, 2009). Actualment s'està estudiant la combinació d'aquests dos fàrmacs en fases clíniques, i mentre en un estudi de fase I indiquen que els fàrmacs poden ser administrats conjuntament a les dosis respectives de tractament individual (de Jonge *et al.*, 2012), en un altre de fase II no observen beneficis de l'administració conjunta i a més a més un increment de la toxicitat (Cristofanilli *et al.*, 2012). Cal indicar però que aquest últim és un estudi en fase II en pacients amb molt baixa prognosi: tumors de mama inflamatoris positius per a ErbB2, que presenten recaigudes i que prèviament havien rebut tractament de cisplatí, i que per tant malauradament les seves possibilitats són ja més reduïdes. Tot i així la inhibició combinada dels receptors de VEGFRs, amb altres fàrmacs antiangiogènics, i receptors de la família dels ErbBs es continua testant en preclínica i ha mostrat resultats positius en models xenògrafs de tumors de cap i coll (Bozec *et al.*, 2007), en tumors de NSCLC resistents a erlotinib (Naumov *et al.*, 2009) i en metàstasis neuronals de tumors de mama (Kodack *et al.*, 2012).

Sumat als resultats positius d'aquests estudis, existeixen inhibidors duals dirigits a la família de VEGFRs i a la família de receptors ErbBs. És el cas de SKLB1206, un inhibidor d'ErbB1 mutat, ErbB2, ErbB4 i VEGFR2 que ha mostrat activitat antitumoral en diferents models, alguns resistents a inhibidors ErbB1 (Pan *et al.*, 2012). O vandetanib, un TKI que bloqueja ErbB1 i VEGFR2, aprovat per la FDA per al tractament de tumors metastàtics de tiroïdes (FDA, [uptadet 6/2011-cited4/2013]). Així doncs la combinació dels dos fàrmacs testats en el nostre estudi podria funcionar no només en TGTs. Queda però testar dosis combinatòries menys tòxiques i que presentin la mateixa efectivitat antitumoral en humans.

La inhibició dels receptors ErbBs en TGTs ha estat poc testada a nivell clínic; fa temps que es va descriure un cas en el que el tractament amb trastuzumab va causar la remissió d'un TGT refractari a CDDP (Kollmannsberger *et al.*, 1999). Per altra banda fa

8 anys que es va iniciar un assaig clínic de fase II per tractar amb gefitinib pacients refractaris de tumors germinals, d'ovari o testicle, positius per ErbB1, tot i així els resultats no han estat publicats encara (Clinicaltrials.gov, 2013 -c).

Així doncs és un camp que encara està per investigar. Els nostres resultats mostren com lapatinib és efectiu en bloquejar el creixement tumoral d'un model de coriocarcinoma ortotòpic, però també en bloquejar la viabilitat cel·lular de quatre línies cel·lulars de tumors testiculars. Suggerim a més a més que la combinació dels inhibidors d'aquests receptors és més eficaç que la inhibició simple, i aportem indicis que ErbB3 pot jugar un paper clau en la progressió d'aquests tumors. No només això, sino que mostrem com la combinació de lapatinib amb l'antiangiogènica pazopanib té efectes sinèrgics aconseguint casi un 90% de la inhibició del creixement tumoral *in vivo*. Tot plegat indica que els receptors ErbBs poden ser una bona alternativa terapèutica en els pacients de TGTs de baixa prognosi.

2. TERÀPIES ANTIANGIOGÈNIQUES

I. Tractament dels TGTs amb antiangiogènics

Des que Judah Folkman va parlar del concepte d'angiogènesi tumoral (Folkman, 1971), aquest ha estat un camp àmpliament investigat i actualment ja hi ha molts fàrmacs amb dianes i activitat antiangiogènica en desenvolupament i molts aprovats ja per la FDA.

En el nostre estudi hem volgut testar l'eficàcia de l'antiangiogènica pazopanib en diversos models de TGTs, tant *in vivo* com *in vitro*.

En els resultats presentats mostrem com pazopanib és eficaç a l'hora d'inhibir el creixement tumoral en dos models de TGTs: en el TGT38, un coriocarcinoma sensible a CDDP (Castillo-Avila et al., 2009); i en el TGT44, un nou model de tumor de sac vitel·lí resistent a CDDP. En el TGT38 pazopanib inhibeix entre el 50 i el 70% el creixement tumoral. Per altra banda pazopanib inhibeix en un 60% el creixement tumoral del TGT44, un nou model ortotòpic resistent a CDDP. Estudis previs realitzats en el nostre grup d'investigació havien demostrat eficàcia de sunitinib en la inhibició del creixement tumoral de varis models de TGT, entre els quals hi havia el TGT38 i el seu tumor derivat resistent a CDDP, el TGT38R (Castillo-Avila et al., 2009). El tractament de pazopanib en el TGT38 es va realitzar per avaluar l'eficàcia del fàrmac en un dels models de TGT més agressius, el de coriocarcinoma. I encara que són experiments diferents i és arriscat comparar-los, podem dir que observem un efecte semblant d'ambdós fàrmacs en aquest model tumoral, encara que potser lleugerament superior l'efecte de sunitinib. Per altra banda, i tot i que també s'havia testat l'eficàcia de sunitinib en un model resistent a CDDP, nosaltres vam avaluar l'eficàcia de pazopanib en un altre model també resistent a CDDP, el TGT44. La importància i tret diferencial del TGT44 respecte el TGT38R, és que prové d'un pacient que va presentar refractorietat a la primera línia de CDDP i que manté aquesta resistència intrínseca en el model animal. El TGT38R, en canvi, era un model de resistència adquirida a CDDP generada en el model animal per administració continuada de CDDP, i no en el pacient humà. En la caracterització histològica del TGT44 no es van observar grans diferències entre el model ortotòpic i la peça tumoral originària del pacient, mantenint així les característiques histopatològiques del tumor primari a l'ortotòpic. Per altra banda també vam comprovar que aquesta resistència a CDDP es mantenia en el tumor implantat en ratolí. El TGT44 doncs és un nou model de tumor testicular *in vivo* que ofereix la possibilitat de treballar en el context de resistència

intrínseca o *de novo*, i d'estudiar els mecanismes d'aquesta resistència podent-los comparar amb els de la resistència adquirida.

L'activitat antiangiogènica de pazopanib ha quedat confirmada a l'observar, en ambdós models, una reducció significativa del nombre de vasos i de l'àrea positiva per CD31. Hem confirmat també l'activitat antitumoral de pazopanib a l'observar una reducció significativa del nombre de cèl·lules tumorals positives per el marcador de proliferació Ki67 en el TGT38. I per altra banda, la inhibició de la viabilitat cel·lular de dues línies de TGTs, les SuSa i les GCT27, demostra que el fàrmac també afecta directament a la cèl·lula tumoral. Així doncs pazopanib afecta la vasculatura tumoral a l'inhibir VEGFRs i PDGFRs, i alhora la mateixa inhibició de PDGFRs o d'altres receptors com c-KIT pot afectar també la cèl·lula tumoral. En el desenvolupament d'aquest fàrmac ja es va veure aquesta capacitat dual, inhibint el creixement tant de cèl·lules endotelials com tumorals *in vitro* i *in vivo* (Podar et al., 2006). En aquest estudi hem corroborat que pazopanib té activitat antiangiogènica i antitumoral en models tumorals de TGTs.

Encara que no són molts, existeixen evidències de teràpies dirigides contra RTKs com PDGFRs en pacients de TGTs amb recaigudes o refractarietats a CDDP. El primer en ser avaluat va ser imatinib en pacients c-KIT positius, però no va mostrar activitat (Einhorn et al., 2006). Ha mostrat activitat en dos casos individuals de seminomes (Pectasides et al., 2008; Pedersini et al., 2007), tot i així s'acaba de realitzar un estudi clínic tractant amb imatinib en tumors avançats o refractaris de testicle i ovari, però els resultats no han estat publicats (Clinicaltrials.org, [Updated 2013 Jan.; cited 2013 April 4].). La suramina, que inhibeix PDGF, FGF i IGFI, tot i bloquejar el creixement de cèl·lules de teratocarinoma *in vitro* va fallar en mostrar benefici en el tractament de 14 pacients de TGT (Motzer et al., 1993).

La teràpia antiangiogènica s'ha proposat com a nova estratègia per el tractament dels TGTs (Fenner et al., 2008; Piulats et al., 2009). El tractament amb nous inhibidors dels receptors VEGFRs i PDGFRs amb activitat antiangiogènica també han mostrat resultats positius en el bloqueig del creixement d'aquests tumors (Nitzsche et al., 2010), i sunitinib ha mostrat eficàcia en estudis preclínics en línies cel·lulars i en models animals de TGTs sensibles i resistents a CDDP (Castillo-Avila et al., 2009; Oechsle et al., 2011a). En pacients però el tractament amb sunitinib ha mostrat una activitat moderada (Oechsle et al., 2011a), i en dos estudis clínics fase II, Feldman *et al.* no van observar millores significatives de sunitinib en el tractament de pacients de TGT amb recaigudes o

refractaris a CDDP. Tot i així sí que observen una baixada dels marcadors tumorals, suggerint que les vies inhibides per sunitinib són importants per a la biologia d'aquests tumors (Feldman et al., 2012; Feldman et al., 2010). Bevacizumab és un altre antiangiogènec que s'ha administrat en pacients de TGTs, encara que no en un assaig clínic. Existeixen dos casos individuals on va ser administrat sol o combinat amb quimioteràpia, en tots dos es va frenar la progressió de la malaltia, observant com mentre s'administrava l'antiangiogènec la progressió del tumor s'aturava, sense obtenir però respostes complertes (Mego et al., 2007; Voigt et al., 2006). Així doncs, malgrat els bons resultats en els estudis preclínic, sembla que sunitinib no té massa bons resultats en el tractament clínic dels TGTs. Aquesta falta de relació dels resultats entre estudis preclínic i assajos clínic és un problema que estan patint els tractaments antiangiogènics en general en molts models tumorals (Ebos and Kerbel, 2011).

Des de fa varies dècades que s'obtenen molts bons resultats en les teràpies antiangiogèniques a nivell preclínic, mentre que a nivell clínic aquestes presenten resultats molt modestos. I és que els pacients de diversos tipus de tumors diferents tractats amb teràpies anti-VEGF responen molt poc o pràcticament ni responen (Ebos and Kerbel, 2011), a excepció del tumor renal, que és el que presenta millor resposta a les teràpies antiangiogèniques degut al seu fenotip angiogènec-dependent. En aquests tumors s'hi detecta amb molta freqüència la mutació de VHL (*von Hippel-Lindau*), que incrementa els nivells actius del factor de transcripció HIF1 α i dels seus gens de resposta, que molts són gens angiogènics com: VEGF, PDGF o angiopoietines (Kim and Kaelin, 2004; Moserle and Casanovas, 2013; Rini and Small, 2005). És en el tractament dels pacients amb RCC metastàtic on s'administren com a monoteràpies els TKIs contra VEGFRs, sunitinib, sorafenib i pazopanib (Escudier et al., 2013).

Com és doncs que els resultats positius obtinguts en preclínica no es traslladen a la clínica? Hi poden haver diversos factors que poden estar esbiaixant els resultats tant d'una banda com de l'altra. Per una banda pot influir la gran diferència que existeix en els estadis de les malalties on es testen els fàrmacs. En la clínica els antiangiogènics s'avaluen en estadis avançats i metastàtics dels tumors, mentre que en els models animals s'avaluen els fàrmacs en tumors primaris i molt més localitzats (Ebos and Kerbel, 2011).

Per altra banda poden influir els paràmetres que s'utilitzen com a punts finals dels assajos clínic. Molts agents citostàtics, a diferència dels citotòxics, provoquen una

prolongació de la supervivència i una estabilització de la malaltia, o necrotització del tumor més que una reducció del volum tumoral. I l'avaluació d'aquests fàrmacs utilitzant la resposta objectiva (reduccions de volum tumoral del 30% + respostes complertes) com a criteri de punt final dels assajos clínics pot pronosticar falses ineficàcies (Feldman et al., 2012). Per altra banda, i encara no es coneix el motiu, en molts assajos clínics de fase III amb antiangiogènics existeix una diferència entre la supervivència global (OS) i la supervivència lliure de progressió (PFS), i sembla que els beneficis de la PFS no es reflecteixen en la OS (Ebos and Kerbel, 2011). En alguns casos s'ha observat creixement o més creixement del tumor en els períodes on s'ha aturat el tractament antiangiogènic (Cacheux et al., 2008; Desar et al., 2009); aquest efecte podria allargar la PFS, sense afavorir però la supervivència global (Ebos and Kerbel, 2011). Per altra banda s'ha vist que el tractament després d'un creixement pot aportar millores en la supervivència global, així com el tractament discontinu amb bevacizumab o l'administració seqüencial de diferents fàrmacs com sorafenib i sunitinib (Dudek et al., 2009; Grothey et al., 2008; Hammers et al., 2010; Stein et al., 2008). Així doncs cal tenir en compte que no només és el fàrmac que s'administra, sinó com s'administra.

En l'aspecte de com s'administra un fàrmac tornem altra vegada a la combinació de diferents inhibidors. El problema és trobar els millors fàrmacs a combinar i estudiar-ne les dosis per aconseguir efecte antitumoral i reduir la toxicitat, i de fet la combinació de fàrmacs es duu a terme en la clínica en molts tumors. La combinació dels antiangiogènics amb la quimioteràpia, encara que ha donat bons resultats en alguns tumors (Moore et al., 2007; Ulahannan and Brahmer, 2011), en d'altres no i sembla que podria dependre del tipus tumoral a tractar i de l'estadi del tumor, però encara existeix controvèrsia (Boere et al., 2009; Ebos and Kerbel, 2011). Tot i així, si tenim en compte la hipersensibilitat dels TGTs a la quimioteràpia, i que en aquest sentit són un cas bastant excepcional, es podria considerar aportar aquesta opció a la clínica d'aquests tumors. De fet la combinació de sunitinib amb cisplatí es va testar en els models de TGTs ortotòpics obtenint reducció tumoral en tots els models testats, i també en el resistent al quimioterapèutic (Castillo-Avila, 2009). Recentment Jain *et al.* han publicat que el tractament de pacients de TGTs refractaris amb oxaliplatí i bevacizumab ha tingut resultats modestos. Tot i que no s'han assolit els 12 mesos de supervivència lliure de malaltia, de 99 pacients 8 han presentat respostes objectives, inclosa una remissió completa (Jain et al., 2013).

Ja per acabar no deixar d'esmentar que s'han d'avaluar marcadors que puguin predir algunes respostes a determinades teràpies, i per altra banda cal també seleccionar els pacients a tractar segons les dianes que presenten. Els nostres models expressaven algunes dianes de pazopanib en les cèl·lules tumorals. És cert que els nivells d'expressió no sempre correlacionen amb l'efectivitat de les teràpies, com hem vist en la inhibició dels ErbBs, però tot i així s'han d'avaluar i continuar investigant, per poder fer una bona selecció dels pacients a tractar.

Tot plegat indica que encara s'han d'estudiar molts aspectes de les teràpies antiangiogèniques, i que probablement adaptant els assajos clínics i els models preclínics que s'estan utilitzant es podrà arribar a trobar el mètode més efectiu d'administració d'aquests.

II. Pazopanib, i altres antiangiogènics

Pazopanib és un inhibidor que està dirigit als tres receptors de la família dels receptors de VEGF, VEGFR-1, -2 i -3; als dos receptors de la família de PDGFs, PDGFR α i PDGFR β , i c-KIT (Kumar et al., 2007).

Sunitinib i sorafenib són dos TKIs que presenten un espectre de les cinases dianes molt semblant al de pazopanib, encara que existeixen petites diferències que poden ser importants. Sorafenib és el que inhibeix menys dianes amb una IC₅₀ < 1 μ M. Els tres inhibidors presenten la mateixa potència d'inhibició dels receptors de la família de VEGFR; pazopanib i sunitinib són igualment actius alhora d'inhibir c-KIT mentre sorafenib ho és molt menys; i sunitinib inhibeix molt millor Flt-3, mentre que pazopanib i sorafenib són més efectius al bloquejar c-RAF. Els tres TKIs mostren una activitat molt semblant a l'hora d'inhibir PDGFR α i PDGFR β (Kumar et al., 2009).

Els tres fàrmacs estan aprovats per al tractament de pacients amb RCC avançat, tot i així en aquests pacients el tractament de primera línia més comú és sunitinib (Rini and Al-Marrawi, 2011). Comparant estudis clínics independents que s'havien realitzat amb cadascun dels fàrmacs, es van veure petites diferències sobretot amb la tolerabilitat dels fàrmacs, sense poder arribar a cap conclusió ferma (Ward and Stadler, 2010).

No ha estat fins ara que s'han publicat els resultats dels primers assaigs clínics comparatius directes entre sunitinib i pazopanib. En un estudi de fase III s'ha comparat

pazopanib i sunitinib com a tractaments de primera línia en pacients de RCC metastàtics. Els resultats indiquen que mentre l'efectivitat antitumoral dels dos fàrmacs és semblant, la qualitat de vida dels pacients és millor quan reben el tractament amb pazopanib (Escudier et al., 2013). I en la mateixa línia de resultats en un altre assaig clínic han avaluat les preferències dels pacients sobre el tractament amb pazopanib o sunitinib, i els resultats han demostrat clarament major tolerabilitat de pazopanib per davant de sunitinib (Escudier BJ. et al., 2012). Queda palès doncs que amb el mateix efecte antitumoral, pazopanib és millor que sunitinib degut a la major tolerabilitat en els pacients.

Així doncs amb aquests arguments pazopanib encara es perfila millor com a candidat a testar com a nova teràpia alternativa a la quimioteràpia en els pacients TGTs refractaris a CDDP, i no només perquè ha mostrat activitat en un model resistent, sinó també perquè en aquest estudi hem detectat que els TGTs amb resistència adquirida a CDDP sobreexpressen PDGFR β i són addictes a la seva senyalització.

3.RESISTÈNCIA A CDDP

I. L'activació de l'eix autocrí PDGF-BB/PDGFR β /AKT aporta resistència a CDDP

En aquesta tesi hem demostrat l'activació de l'eix PDGF-BB/PDGFR β /AKT com a mecanisme de resistència adquirida en cèl·lules de TGTs.

L'activació de la via PI3K/AKT, al ser una via de senyalització intracel·lular que regula la supervivència, la proliferació i atura l'apoptosi, és un mecanisme descrit de resistència als tractaments de radioteràpia, quimioteràpia i teràpies dirigides (Siddik, 2003). De fet s'ha vist que el tractament amb CDDP indueix l'activació de la via PI3K/AKT (Huang and Hung, 2009), i l'activació d'AKT s'ha associat a l'adquisició de resistència a CDDP en cèl·lules de pulmó i ovari (Abedini et al., 2010; Liu et al., 2007). Liu *et al.* van demostrar que la sobreexpressió d'AKT aportava resistència a les cèl·lules parentals, mentre que el bloqueig d'AKT en les cèl·lules resistents incrementava la sensibilitat al quimioterapèutic (Liu et al., 2007). I diversos estudis mostren que microRNAs que tenen com a diana directe a PTEN, participen en la regulació de la via PI3K/AKT i en l'adquisició de resistència a CDDP en cèl·lules d'ovari i osteosarcoma (Fu et al., 2012; Yang et al.,

2008; Zhao et al., 2013). Nosaltres hem mostrat que els nivells d'activació d'AKT correlacionen linealment amb la sensibilitat al quimioterapèutic, i que la seva inhibició amb Ly294002 provoca una resensibilització a CDDP de les cèl·lules resistents; demostrant que l'activació d'AKT aporta resistència a les cèl·lules de tumors testiculars.

En el context de quimioresistència l'activació d'AKT promou l'exclusió nuclear de p21 fet que provoca una aturada en el cicle cel·lular, i afavoreix la resistència a CDDP ja que permet més temps per reparar el DNA (Siddik, 2003). Per altra banda AKT bloqueja proteïnes pro-apoptòtiques com Bax o la procaspasa 9 (Mitsiades et al., 2002), i AKT activa Mdm2, el regulador negatiu de p53, inhibint doncs la proteïna supressora tumoral involucrada també en resistència a CDDP. Recentment s'ha descrit que AKT promou la quimioresistència en cèl·lules d'ovari bloquejant la interacció de p53 amb la proteïna anti-apoptòtica FLIP, impeding la seva degradació via proteasoma i impeding l'apoptosi induïda per CDDP (Abedini et al., 2010).

L'activació d'AKT és resultat d'una desregulació de la via de PI3K, i que pot tenir origen en la presència de mutacions activadores en PIK3CA, una pèrdua de PTEN, una mutació activadora o amplifcació del mateix AKT, o bé una desregulació en els RTKs que senyalitzen via PI3K/AKT (Yuan and Cantley, 2008).

La pèrdua d'un al·lel de PTEN provoca el creixement tumoral acompanyat d'altres mutacions somàtiques, i els seus nivells d'expressió correlacionen amb el grau de severitat de la malaltia (Salmena et al., 2008). La pèrdua de funció de PTEN és una alteració que s'observa en molts tumors, però nosaltres hem descartat la pèrdua de PTEN total com a causa de l'activació d'AKT en les cèl·lules resistents a CDDP. Les mutacions en AKT no són tant freqüents com les que es troben en PTEN o en PIK3CA, però sí que se n'han observat que aporten una activació constitutiva i una expressió d'AKT constant a membrana (Hafsi et al., 2011). En les nostres cèl·lules hem observat com la retirada del sèrum del medi aturava l'activació d'AKT, descartant així una mutació que aportés l'activació constitutiva de la cinasa. A més a més hem observat com el tractament amb uns determinats inhibidors o estimuladors, inhibia o activava respectivament AKT suggerint que la desregulació venia per part de la senyalització per sobre de PI3K/AKT. PI3K s'activa per sota de molts RTKs, i per tant una desregulació d'aquests RTKs, ja sigui per activació constitutiva, amplifcació o sobreactivació per part dels lligands que els estimulen poden comportar una sobreactivació de PI3K/AKT (Yuan and Cantley, 2008).

La presència de PDGF-B en el medi activava AKT només en les cèl·lules sensibles, i de manera diferencial amb altres factors de creixement testats. Per altra banda, de diversos inhibidors testats tant sols pazopanib i sunitinib, ambdós inhibidors de PDGFR β , inhibien els nivells de pAKT i de la mateixa manera que ho feia l'inhibidor específic Ly294002. A més a més les cèl·lules resistents eren més sensibles al tractament amb aquests dos inhibidors que les cèl·lules sensibles. Tots aquests resultats mostraven que l'activació d'AKT en les cèl·lules resistents era dependent de PDGF-B/PDGFR β , i que aquestes cèl·lules eren addictes a aquesta via de senyalització. A més a més, en les cèl·lules resistents hem detectat una sobreexpressió de PDGFR β respecte els nivells expressats en les cèl·lules sensibles, així com una sobreexpressió de l'mRNA del lligand d'aquest receptor, PDGF-B.

La senyalització per part de RTKs a AKT com a mecanisme de resistència a CDDP s'ha descrit en diversos tumors i per part de diversos receptors. Així per exemple en cèl·lules d'osteosarcoma resistents a CDDP el receptor c-MET es troba sobreexpressat, i la seva inhibició suprimeix la via PI3K/AKT i sensibilitza les cèl·lules al quimioterapèutic (Wang et al., 2012). L'activació d'AKT a través de ErbB1/ErbB3 en cèl·lules de glioma i ovari també s'ha associat a la quimioresistència (Servidei et al., 2008). O la senyalització d'ErbB2/ErbB3 via PI3K/AKT s'associa a resistència a diversos quimioterapèutics en cèl·lules de càncer de mama (Knuefermann et al., 2003), i de fet els pacients que sobreexpressen ErbB2 presenten resistència als quimioterapèutics (Zhang et al., 2003).

Pel que fa a la senyalització de PDGF-B/PDGFR β també s'ha descrit en el context de quimioresistència. En cèl·lules de tumor hepàtic s'ha descrit el *loop* autocrí AKT/HIF1- α /PDGF-BB la senyalització del qual confereix quimioresistència (Lau et al., 2009). L'estimulació de PDGF-BB/PI3K aporta resistència a paclitaxel en cèl·lules de tumor d'ovari (Isonishi et al., 2007), i en cèl·lules mare quimioresistents de càncer de pulmó s'ha vist que entre d'altres factors, sobreexpressen PDGF-BB (Levina et al., 2008). Servidei *et al.* van descriure una associació, encara que no una relació causal, entre la senyalització de PDGF-BB i la quimioresistència en cèl·lules de glioma. Mostren com, malgrat no troben sobreexpressió del receptor PDGFR β , l'expressió autocrina de PDGF-BB activa AKT en les cèl·lules resistents, que a més a més també són més sensibles a l'inhibidor del receptor imatinib (Servidei et al., 2006).

Per demostrar que la senyalització PDGF-BB/PDGFR β /AKT era un mecanisme de resistència adquirida a CDDP en les cèl·lules de tumor testicular vam inhibir l'expressió del receptor i vam avaluar la sensibilitat de les cèl·lules a l'agent quimioterapèutic. Aquesta aproximació la vam realitzar de dues maneres, amb inhibició farmacològica tractant amb pazopanib, i inhibint genèticament l'expressió del receptor, transduint les cèl·lules amb constructes lentivirals shRNA.

L'administració de pazopanib resensibilitzava les cèl·lules resistents al tractament amb CDDP, obtenint valors de la IC₅₀ molt semblants en les cèl·lules sensibles i les resistents tractades amb pazopanib. Pazopanib però inhibeix diversos receptors, i per tenir un model d'inhibició exclusiva de l'expressió de PDGFR β vam generar línies estables amb l'expressió del receptor suprimida per la transducció de constructes lentivirals shRNA per PDGFR β . De quatre virus testats, tant sols un ens va inhibir l'expressió del receptor. La manca d'efectivitat a l'hora d'obtenir baixos nivells d'expressió de PDGFR β en les cèl·lules transduïdes pot ser deguda a l'addicció de les cèl·lules per aquest receptor. Tot i així, en un dels clons havíem obtingut reducció de l'expressió del receptor; i encara que no s'havia obtingut una inhibició total, sí que presentava nivells semblants al de les cèl·lules sensibles. La supressió de l'expressió de PDGFR β provocava una disminució dels nivells actius d'AKT, i una resensibilització a CDDP. No s'obtenien nivells diferents de la IC₅₀ entre les cèl·lules resistents i les shP β 4, però sí que s'obtenien diferències significatives de sensibilitat a CDDP en la dosi de 0,1 μ g/ml. Encara que aquests resultats no eren tan robustos, conjuntament amb els obtinguts amb el tractament amb pazopanib, mostraven com efectivament la inhibició del receptor PDGFR β en les cèl·lules resistents a CDDP revertia aquest fenotip ja que s'incrementava la sensibilitat al fàrmac.

Havíem descrit doncs un *loop* autocrí d'activació de PDGF-BB, amb desregulació de PDGFR β i activació d'AKT, com a mecanisme de resistència adquirida en TGTs *in vitro*. Per anar més enllà vam voler estudiar-ho en models de TGTs sensibles i resistents *in vivo* utilitzant els models ortotòpics dels que disposàvem al laboratori. Els resultats obtinguts van mostrar un increment de PDGFR β en un model de resistència adquirida, i un augment de PDGFR α en un model de resistència intrínseca. En aquest últim cas vam comparar el TGT1 i el TGT44. Ambdós tumors tenien el component histològic de sac vitel·lí, i mentre el TGT1 era sensible a CDDP (Castillo-Avila et al., 2009) el TGT44 era resistent. Els resultats obtinguts de la comparativa d'aquesta parella de tumors és

menys fiable, ja que només comparteixen el component histològic i és com si comparéssim dos pacients diferents, hauríem d'incrementar el nombre de casos. L'altra parella de tumors utilitzada i en la que hi hem observat la sobreexpressió de PDGFR β , és la formada pel coriocarcinoma sensible TGT38 i el seu tumor derivat amb resistència adquirida el TGT38R (Castillo-Avila et al., 2009). Els resultats de la comparativa d'aquests dos tumors són més robustos ja que comparteixen el mateix fons genètic. Aquest model s'assembla més a les parelles de cèl·lules utilitzades en els estudis *in vitro*, i en el que s'han obtingut els mateixos resultats de sobreexpressió de PDGFR β .

En el TGT38R però no hem observat més expressió de PDGF-B que en la seva parella sensible. Els gens analitzats per RT-PCR són els humans i per tant el lligand produït per les cèl·lules tumorals. S'ha descrit que les cèl·lules estromals, com els CAFs (*cancer associated fibroblasts*), poden produir diversos factors de creixement com PDGF-C (Crawford et al., 2009) o FGF2 (Pietras and Ostman, 2010). Al ser un tumor *in vivo* hauríem d'analitzar també els nivells de PDGF-B produït per l'estroma del tumor utilitzant oligonucleòtids específics per als gens murins.

Està descrit que en cèl·lules de glioma l'expressió de PDGF-B pot ser induïda per la senyalització de TGF β /Smad, quan el promotor del gen de PDGF-B no es troba metil·lat (Bruna et al., 2007). Hem descartat que aquest mecanisme sigui el que activa el *loop* autocrí descrit en les nostres cèl·lules ja que a l'inhibir el receptor TGF β RII els nivells de pAKT no es van veure afectats. Per altra banda també hem descartat l'estat de metilació del promotor del gen de PDGFR β com a mecanisme de regulació de la seva expressió, malgrat no hem mostrat els resultats. A més a més el TGT38 i el TGT38R s'han comparat genèticament pel Dr. Alberto Villanueva, i no s'ha detectat cap mutació en cap dels gens involucrats en el *loop* descrit. Recentment també s'han descrit involucrats microRNAs o diversos factors de transcripció en la resistència a CDDP (Grande et al., 2012; Pogribny et al., 2010). Si algun d'aquests mecanismes està implicat en la desregulació de l'expressió de PDGFR β que implica resistència en les cèl·lules de TGT és una línia d'investigació que queda oberta arrel del nostre estudi.

Ja per acabar vam voler analitzar l'expressió de PDGFR β en el TMA de tumors testiculars per veure si la seva expressió es podia correlacionar amb el fenotip resistent. El TMA era una bona eina per dur a terme aquesta aproximació ja que engloba moltes mostres de tumors tractats amb CDDP que han mostrat tant sensibilitat com resistència a CDDP.

Tot i observar nivells d'expressió de PDGFR β molt elevats en més del 70% dels TGTNS, quan vam comparar els pacients sensibles i els resistent a CDDP no vam observar cap diferència. En canvi quan vam analitzar específicament els tumors que contenien component de coriocarcinoma vam veure diferències, encara que no significatives. Els casos analitzats han sigut molt pocs, i necessitaríem augmentar el nombre de casos per poder calcular significativitat estadística. Hem de tenir en compte que estem treballant amb mostres molt poc freqüents; els tumors TGTs que presenten resistència a CDDP són greus però pocs, i el coriocarcinoma és un dels components menys freqüents (Bahrami et al., 2007). Per altra banda tampoc disposem de la informació del percentatge present del component coriocarcinoma respecte el tumor total, però és un aspecte que podria influir en els resultats i la seva interpretació. D'aquests resultats també cal remarcar que els tumors ortotòpics on havíem observat diferències, el TGT38-TGT38R, també eren coriocarcinomes, suggerint doncs que potser PDGFR β sí que jugaria un paper important en aquest component tumoral, el més agressiu dins els TGTNS. A més a més en el TMA existeix un cert biaix de les mostres, ja que totes les que hi estan englobades són de pacients que tots han estat tractats amb CDDP, i que per tant ja tenien un fenotip una mica més agressiu, amb invasió vascular (Albers et al., 2011). Faltaria analitzar les mostres dels pacients amb els tumors més benignes en els que no va caldre realitzar quimioteràpia. Sense aquests anàlisi no es pot afirmar res, però les mostres analitzades, amb fenotip clínic més agressiu, presenten nivells molt elevats d'expressió de PDGFR β i en elevada freqüència.

L'anàlisi de mostres de pacients és més complexa que l'anàlisi *in vitro* amb línies cel·lulars, o fins i tot que en tumors ortotòpics. Les mostres de pacients poden tenir molta més variabilitat, ja sigui de components histològics, de tractaments rebuts o de fons genètic. Tant en cèl·lules com en tumors, hem analitzat parelles de models de resistència adquirida a CDDP. Les mostres de pacients humans poden presentar resistència intrínseca o resistència adquirida, i en aquest últim cas probablement no disposarem de les dues mostres que realment s'haurien de comparar: la prèvia i la posterior a l'adquisició de la resistència, tal i com ho hem fet amb els altres models.

Un altre motiu pel que potser no estaríem obtenint la correlació d'expressió de PDGFR β amb la resistència a CDDP en el TMA, és degut als múltiples mecanismes que poden provocar resistència a CDDP i la coexistència entre ells. Rarament participa només un mecanisme de resistència, i per això és difícil trobar una relació directe (Galluzzi et al., 2012). Cert que en els nostres resultats presentem una correlació lineal entre nivells de

pAKT i sensibilitat a CDDP, però ho hem estudiat en un sistema més simple (les cèl·lules *in vitro*) en el que observar aquestes relacions seria més fàcil. Una altra opció amb la que probablement milloraríem la sensibilitat de l'anàlisi, és estudiar els nivells d'AKT actiu en el TMA. Malauradament no hem pogut posar a punt la tècnica de detecció de pAKT en parafina i no ho hem pogut realitzar. Hem valorat l'opció de detectar pSK6, una cinasa activada per mTOR un cop activat AKT (Manning and Cantley, 2007), ja que tenim la tècnica de detecció en parafina posada a punt al laboratori. Malauradament no hem observat correlació en les cèl·lules entre els nivells d'AKT actius i els nivells actius d' SK6.

Tot plegat, i encara que no hem pogut relacionar els nivells de PDGFR β amb la resistència a CDDP en mostres de pacients del TMA, no podem descartar la presència de l'activació de la via PDGF-BB/PDGFR β /AKT com a mecanisme de resistència en pacients resistents a CDDP.

II. Resistència a CDDP en els TGTs

La implicació de la senyalització de PDGF-B/PDGFR β /AKT en resistència a CDDP, és un resultat que encara dona més força a l'eficàcia de sunitinib o pazopanib en el tractament de pacients resistents a CDDP de TGTs (Castillo-Avila et al., 2009). Aquests fàrmacs tindrien l'efecte dual inhibint la vasculatura i la cèl·lula tumoral, a més de bloquejar una possible resistència mitjançada per PDGF-B/PDGFR β /AKT.

A més a més és el primer cop que es demostra implicació de PDGF-B/PDGFR β en l'adquisició de resistència a CDDP en els TGTs. En un estudi en el que identificaven vies de senyalització afectades per la modulació de l'expressió gènica induïda per CDDP en cèl·lules de TGT, van descriure la via angiogènica i la via de senyalització de PDGF (Duale et al., 2007). I en un altre estudi van detectar guany de la regió cromosòmica 5q33.1-5q35-3, que és en la que es troba el gen de PDGFR β , en unes cèl·lules de TGT resistents a CDDP, encara que al no ser reproduït en dues línies més (les GCT27 i les SuSa) aquesta regió no va continuar essent estudiada (Noel et al., 2008).

Pel que fa a AKT, s'ha implicat recentment en la resistència a CDDP en TGTs. Koster *et al.* han descrit com a mecanisme de resistència a CDDP en cèl·lules de carcinoma

embrionari l'expressió citoplasmàtica de p21 degut a una fosforilació realitzada per AKT, de manera que la inhibició d'AKT provoca que p21 retorni al nucli i resensibilitza les cèl·lules a CDDP. Descriuen també una correlació de la forma citoplasmàtica en pacients de carcinoma embrionari resistent a CDDP mentre que els sensibles no presenten nivells d'expressió de p21. Per altra banda observen que l'expressió de p21 en teratomes és majoritàriament nuclear, i suggereixen l'aturada del cicle cel·lular per p21 com a mecanisme de no resposta intrínseca que presenten els teratomes davant el tractament amb CDDP (Koster et al., 2010).

Com ja hem comentat AKT s'ha descrit implicat en la resistència a quimioteràpies i teràpies dirigides, i també en els TGTs. Els nostres resultats donen suport a la idea de la inhibició d'aquesta via en els tumors resistents, i de fet existeix un estudi en curs de fase II per al tractament de pacients de TGTs refractaris a CDDP amb everolimus, un inhibidor d'mTOR, un dels principals efectors directes d'AKT (Clinicaltrials.gov, 2013 -a).

Recentment Harold Varmus i Ed Harlow, per tal d'incentivar i redirigir la recerca oncològica, han realitzat una llista de 24 preguntes provocatives a respondre. Entre elles n'hi ha de tant interessants i rellevants com quina és la implicació de l'obesitat en els càncers?; fins a quin punt l'aparició de tumors es correlaciona amb l'envelliment?; per què els tumors malignitzen després d'anys d'indolència?; com influeix la pressió selectiva imposada per l'ús de les teràpies dirigides de diferents tipus o dosis en l'evolució de la resistència farmacològica dels tumors?; o quines són les propietats moleculars dels tumors que responen tan bé als tractaments quimioterapèutics? En aquest últim cas proposen investigar la resposta a CDDP dels TGTs, ja que a diferència de la majoria de tumors aquests responen molt bé al tractament quimioterapèutic. L'estudi de la sensibilitat i resistència a CDDP dels TGTs pot ajudar a entendre els mecanismes d'aquesta resposta i podria ser traslladat a altres tumors on el tractament quimioterapèutic no és tant eficaç (Varmus and Harlow, 2012a; Varmus and Harlow, 2012b).

Els TGTs han estat un model per al tractament amb quimioteràpia d'altres tumors sòlids, però sempre han anat per darrere d'altres tumors a l'hora de testar i aplicar el tractament amb teràpies dirigides. És cert que es curen el 90% dels pacients dels TGTs, i els TGTs

metastàtics són el tumor metastàtic més curable; però, i com ja hem comentat anteriorment, encara existeixen casos que presenten malalties refractàries i recaigudes resistents al tractament quimioterapèutic presentant mal pronòstic, i on l'únic tractament és la quimioteràpia amb dosis de rescat o tractaments pal·liatius (Koychev et al., 2011). Aquests pacients presenten una prognosi molt baixa, i tenint en compte la incidència d'aquests tumors, seran homes joves entre 15 i 35 anys (Bosl and Motzer, 1997). És per això que es necessiten testar noves teràpies en aquests tumors, i les teràpies dirigides són probablement tan actives en els TGTs com en altres tumors. Un dels principals problemes però és el baix nombre de pacients que fa que els estudis siguin molt més llargs, i la falta també de cooperació internacional per dur a terme aquestes investigacions. I per altra banda també s'ha proposat canviar i adaptar al tumor analitzat els paràmetres de punt final d'aquests assajos clínics de fase II (Feldman et al., 2012). Així doncs el futur d'aquests tumor rau en millorar els assajos clínics i testar encara més fàrmacs nous.

En aquest estudi hem avaluat l'acció de les teràpies antireceptors ErbBs i del fàrmac antiangiogènec pazopanib en models *in vitro*, utilitzant diverses línies cel·lulars de tumors testiculars, i entre elles, parelles de resistència adquirida. Però també hem mostrat eficàcia antitumoral en models de TGT implantats ortotòpicament en ratolins atímics. Cal destacar la importància dels models tumorals utilitzats; ja que provenen de pacients humans, conservant les característiques histològiques i genètiques dels tumors primaris originaris, i que han estat desenvolupats en aquest laboratori pel Dr. Alberto Villanueva.

Hem observat nous mecanismes tumorigènics involucrats en els TGTs, com la formació de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 com a unitat oncogènica en un model de coriocarcinoma ortotòpic, així com la descripció per primer cop de l'expressió d'ErbB3 en aquests tumors. Així com un nou mecanisme de resistència a CDDP. Però el que és més important, aportem resultats que senyalen a pazopanib com a teràpia alternativa per tractar aquests pacients, i probablement amb més èxit si es combina amb lapatinib. I no només això sinó que hem demostrat un mecanisme de resistència a CDDP en TGTs que implica una de les dianes de pazopanib. Així doncs esperem que, amb més resultats preclínic com els nostres que aportin més possibles teràpies, juntament amb la realització de molts més assajos clínics i les readaptacions necessàries d'aquests, s'aconsegueixi millorar la prognosi dels pacients de TGTs que desenvolupen resistència, que encara que són pocs, són importants.

CONCLUSIONS

Els receptors ErbB1, ErbB2 i ErbB3 s'expressen de manera generalitzada en els TGTs ortotòpics de diferent component histològic, mantenint a més a més el patró d'expressió del tumor primari a xenògraft.

L'activitat de l'heterodímer ErbB2/ErbB3 té un paper en el creixement tumoral del TGT38, i senyalitza a través d'AKT, ERK1/2 i STAT3, conferint també resistència *de novo* a les teràpies dirigides anti-ErbB1.

La inhibició dual dels receptors ErbBs és més efectiva que la inhibició senzilla; i el bloqueig d'ErbB1 i ErbB3 té el mateix efecte que la inhibició dual d'ErbB1 i ErbB2, amb lapatinib, en línies cel·lulars de TGTs.

El tractament amb lapatinib bloqueja el creixement tumoral del TGT38, bloquejant la proliferació de les cèl·lules tumorals i provocant un augment de l'apoptosi; i el tractament combinatori de lapatinib amb pazopanib mostra un efecte sinèrgic en la inhibició del creixement tumoral.

Pazopanib mostra activitat antitumoral i antiangiogènica en el tumor sensible a CDDP TGT38 i en el model resistent a CDDP TGT44, així com una activitat directa a les cèl·lules tumorals de TGTs *in vitro*.

L'activació del *loop* PDGF-BB/PDGFR β /AKT és un nou mecanisme de resistència adquirida a CDDP en TGTs.

L'expressió de PDGFR β és més elevada en els TGTs amb component coriocarcinoma resistents a CDDP que els que mostren sensibilitat al quimioterapèutic.

BIBLIOGRAFIA

- Abedini, M. R., Muller, E. J., Bergeron, R., Gray, D. A., and Tsang, B. K. (2010). Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein. *Oncogene* 29, 11-25.
- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cohn-Cedermark, G., Fizazi, K., Horwich, A., and Laguna, M. P. (2011). EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update. *Eur Urol* 60, 304-319.
- Alimandi, M., Romano, A., Curia, M. C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S. A., Di Fiore, P. P., and Kraus, M. H. (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813-1821.
- Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D. J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., *et al.* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 1626-1634.
- Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22, 1276-1312.
- Arora, A., and Scholar, E. M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 971-979.
- Arteaga, C. L., O'Neill, A., Moulder, S. L., Pins, M., Sparano, J. A., Sledge, G. W., and Davidson, N. E. (2008). A phase I-II study of combined blockade of the ErbB receptor network with trastuzumab and gefitinib in patients with HER2 (ErbB2)-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6277-6283.
- Aurisicchio, L., Marra, E., Luberto, L., Carlomosti, F., De Vitis, C., Noto, A., Gunes, Z., Roscilli, G., Mesiti, G., Mancini, R., *et al.* (2012). Novel anti-ErbB3 monoclonal antibodies show therapeutic efficacy in xenografted and spontaneous mouse tumors. *J Cell Physiol* 227, 3381-3388.
- Bahrami, A., Ro, J. Y., and Ayala, A. G. (2007). An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 131, 1267-1280.
- Basciani, S., De Luca, G., Dolci, S., Brama, M., Arizzi, M., Mariani, S., Rosano, G., Spera, G., and Gnassi, L. (2008). Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 149, 6226-6235.
- Basciani, S., Mariani, S., Spera, G., and Gnassi, L. (2010). Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocr Rev* 31, 916-939.
- Baselga, J., and Swain, S. M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9, 463-475.
- Basso, A. D., Solit, D. B., Munster, P. N., and Rosen, N. (2002). Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21, 1159-1166.
- Batzer, A.G., *et al.* (1994). Hierarchy of Binding Sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 5192-5201.
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J. Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., *et al.* (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20932-20937.
- Bellmunt, J., Paz-Ares, L., Cuello, M., Cecere, F. L., Albiol, S., Guillem, V., Gallardo, E., Carles, J., Mendez, P., de la Cruz, J. J., *et al.* (2007). Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic

- marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 18, 522-528.
- Bentas, W., Biecken, W. D., Glienke, W., Binder, J., and Schuldes, H. (2003). Serum levels of basic fibroblast growth factor reflect disseminated disease in patients with testicular germ cell tumors. *Urol Res* 30, 390-393.
- Berger, M. B., Mendrola, J. M., and Lemmon, M. A. (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569, 332-336.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592-603.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., *et al.* (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395-402.
- Berridge, M. J. (2012). *Cell Signalling Biology*. doi:10.1042/csb0001001.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., and Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152.
- Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, F., Sassi, F., Torti, D., Isella, C., Cora, D., Di Nicolantonio, F., Buscarino, M., Petti, C., *et al.* (2011). A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1, 508-523.
- Boere, I. A., Hamberg, P., and Sleijfer, S. (2009). It takes two to tango: combinations of conventional cytotoxics with compounds targeting the vascular endothelial growth factor-vascular endothelial growth factor receptor pathway in patients with solid malignancies. *Cancer Sci* 101, 7-15.
- Bogoyevitch, M. A., Ngoei, K. R., Zhao, T. T., Yeap, Y. Y., and Ng, D. C. (2010). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 1804, 463-475.
- Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (1997). Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 337, 242-253.
- Bozec, A., Formento, P., Lassalle, S., Lippens, C., Hofman, P., and Milano, G. (2007). Dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways in combination with irradiation: antitumour supra-additive effects on human head and neck cancer xenografts. *Br J Cancer* 97, 65-72.
- Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M., and Karran, P. (2000). Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* 19, 3138-3145.
- Broekman, F., Giovannetti, E., and Peters, G. J. (2011). Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World J Clin Oncol* 2, 80-93.
- Bronson, D. L., Andrews, P. W., Solter, D., Cervenka, J., Lange, P. H., and Fraley, E. E. (1980). Cell line derived from a metastasis of a human testicular germ cell tumor. *Cancer Res* 40, 2500-2506.
- Brozovic, A., and Osmak, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 251, 1-16.
- Bruna, A., Darken, R. S., Rojo, F., Ocana, A., Penuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2007). High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 11, 147-160.
- Cacheux, W., Boisserie, T., Staudacher, L., Vignaux, O., Dousset, B., Soubrane, O., Terris, B., Mateus, C., Chaussade, S., and Goldwasser, F. (2008). Reversible tumor growth acceleration following bevacizumab interruption in metastatic colorectal cancer patients scheduled for surgery. *Ann Oncol* 19, 1659-1661.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

- Castillo-Avila, W. (2009). Evaluación de nuevas dianas terapéuticas en un modelo ortotópico murino de tumor germinal testicular humano. Tesis doctoral.
- Castillo-Avila, W., Piulats, J. M., Garcia Del Muro, X., Vidal, A., Condom, E., Casanovas, O., Mora, J., Germa, J. R., Capella, G., Villanueva, A., and Vinals, F. (2009). Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 15, 3384-3395.
- Clinicaltrials.gov (2013 -a). Everolimus in Refractory Testicular Germ Cell Cancer. www.clinicaltrials.gov *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01466231*
- Clinicaltrials.gov (2013 -b). MM-111 in Combination With Herceptin in Patients With Advanced Her2 Amplified, Heregulin Positive Breast Cancer. www.clinicaltrials.gov *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01097460*
- Clinicaltrials.gov (2013 -c). A Phase II Study of Iressa in Patients With Chemo Refractory Germ Cell Tumors Expressing EGFR. www.clinicaltrials.gov *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00198159*
- Clinicaltrials.gov (2013 -d). A Study of MM-111 in Combination With Multiple Treatments in Patients With HER2 Positive Cancer. www.clinicaltrials.gov *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01304784*
- Clinicaltrials.gov (2013 -e). Study of Pazopanib and Doxil in Patients With Advanced Relapsed Platinum-Sensitive or Platinum-Resistant Ovarian, Fallopian Tube or Primary Peritoneal Adenocarcinoma. www.clinicaltrials.gov *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01035658*
- Clinicaltrials.org ([Updated 2013 Jan.; cited 2013 April 4].). Imatinib Mesylate in Treating Patients With Progressive, Refractory, or Recurrent Stage II or Stage III Testicular or Ovarian Cancer. ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00042952.
- Cook, R. S., Garrett, J. T., Sanchez, V., Stanford, J. C., Young, C., Chakrabarty, A., Rinehart, C., Zhang, Y., Wu, Y., Greenberger, L., *et al.* (2011). ErbB3 ablation impairs PI3K/Akt-dependent mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 71, 3941-3951.
- Cornolti, G., Ungari, M., Morassi, M. L., Facchetti, F., Rossi, E., Lombardi, D., and Nicolai, P. (2007). Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133, 1031-1036.
- Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 15, 21-34.
- Cristofanilli, M., Johnston, S. R., Manikhas, A., Gomez, H. L., Gladkov, O., Shao, Z., Safina, S., Blackwell, K. L., Alvarez, R. H., Rubin, S. D., *et al.* (2012). A randomized phase II study of lapatinib + pazopanib versus lapatinib in patients with HER2+ inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137, 471-482.
- Chia, V. M., Quraishi, S. M., Devesa, S. S., Purdue, M. P., Cook, M. B., and McGlynn, K. A. (2010). International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 1151-1159.
- Chow, N. H., Chan, S. H., Tzai, T. S., Ho, C. L., and Liu, H. S. (2001). Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 7, 1957-1962.
- Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* 269, 787-790.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.
- de Jonge, M. J., Hamberg, P., Verweij, J., Savage, S., Suttle, A. B., Hodge, J., Arumugham, T., Pandite, L. N., and Hurwitz, H. I. (2012). Phase I and pharmacokinetic study of pazopanib and lapatinib combination therapy in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*.
- Desar, I. M., Mulder, S. F., Stillebroer, A. B., van Spronsen, D. J., van der Graaf, W. T., Mulders, P. F., and van Herpen, C. M. (2009). The reverse side of the victory: flare up of symptoms

- after discontinuation of sunitinib or sorafenib in renal cell cancer patients. A report of three cases. *Acta Oncol* 48, 927-931.
- Duale, N., Lindeman, B., Komada, M., Olsen, A. K., Andreassen, A., Soderlund, E. J., and Brunborg, G. (2007). Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* 6, 53.
- Dudek, A. Z., Zolnierek, J., Dham, A., Lindgren, B. R., and Szczylik, C. (2009). Sequential therapy with sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer* 115, 61-67.
- Duran, I., Garcia-Velasco, A., Ballestin, C., Garcia, E., Martinez-Tello, F., Pond, G. R., Garcia-Carbonero, R., Cortes-Funes, H., and Paz-Ares, L. (2010). Expression of EGFR, HER-2/neu and KIT in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol* 12, 443-449.
- Ebos, J. M., and Kerbel, R. S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 210-221.
- Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., and Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232-239.
- ECO (2013). European Cancer Observatory-International Agency for Research Cancer. World Health Organization <http://eco.iarc.fr/Default.aspx>.
- Eichhorn, P. J., Gili, M., Scaltriti, M., Serra, V., Guzman, M., Nijkamp, W., Beijersbergen, R. L., Valero, V., Seoane, J., Bernards, R., and Baselga, J. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BE235. *Cancer Res* 68, 9221-9230.
- Einhorn, L. H., Brames, M. J., Heinrich, M. C., Corless, C. L., and Madani, A. (2006). Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol* 29, 12-13.
- Einhorn, L. H., and Donohue, J. (1977). Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* 87, 293-298.
- Engelman, J. A., Janne, P. A., Mermel, C., Pearlberg, J., Mukohara, T., Fleet, C., Cichowski, K., Johnson, B. E., and Cantley, L. C. (2005). ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3788-3793.
- Engelman, J. A., Luo, J., and Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.
- Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., Kulmala, J., Pulkkinen, J., Grenman, R., and Elenius, K. (2006). Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 12, 4103-4111.
- Escudier, B., Albiges, L., and Sonpavde, G. (2013). Optimal Management of Metastatic Renal Cell Carcinoma: Current Status. *Drugs*.
- Escudier BJ., Camillo Porta, Petri Bono, Ugo De Giorgi, Omi Parikh, Robert E. Hawkins, Emmanuel Sevin, Sylvie Negrier, Sadya Khan, Lauren McCann, *et al.* (2012). Patient preference between pazopanib (Paz) and sunitinib (Sun): Results of a randomized double-blind, placebo-controlled, cross-over study in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC)—PISCES study, NCT 01064310. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr CRA4502).
- Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., and Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 6, 734-745.
- FDA ([updated 1/2012-cited 4/2013]). Axitinib. US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm289439.htm>.

- FDA ([updated 1/2013-cited 4/2013]). FDA approves Gleevec for children with acute lymphoblastic leukemia. US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm336868.htm>.
- FDA ([updated 2/2013-cited 4/2013]). Ado-Trastuzumab Emtansine US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm340913.htm>.
- FDA ([updated 4/2012-cited 4/2013]). Pazopanib. US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm302090.htm>.
- FDA ([updated 6/2012-cited 4/2013]). Pertuzumab US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm307592.htm>.
- FDA ([updated 7/2012-cited 4/2013]). Everolimus 2012. US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm313008.htm>.
- FDA ([updated 6/2011-cited 4/2013]). FDA approves new treatment for rare form of thyroid cancer US Food and Drug Administration website: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm250168.htm>.
- Feldman, D. R., Patil, S., Trinos, M. J., Carouso, M., Ginsberg, M. S., Sheinfeld, J., Bajorin, D. F., Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (2012). Progression-free and overall survival in patients with relapsed/refractory germ cell tumors treated with single-agent chemotherapy: endpoints for clinical trial design. *Cancer* 118, 981-986.
- Feldman, D. R., Turkula, S., Ginsberg, M. S., Ishill, N., Patil, S., Carouso, M., Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (2010). Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs* 28, 523-528.
- Fenner, M. H., Beutel, G., and Grunwald, V. (2008). Targeted therapies for patients with germ cell tumors. *Expert Opin Investig Drugs* 17, 511-522.
- Fijolek, J., Wiatr, E., Rowinska-Zakrzewska, E., Giedronowicz, D., Langfort, R., Chabowski, M., Orłowski, T., and Roszkowski, K. (2006). p53 and HER2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 21, 81-87.
- Fink, D., Aebi, S., and Howell, S. B. (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4, 1-6.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57, 1-18.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273-286.
- Fu, X., Tian, J., Zhang, L., Chen, Y., and Hao, Q. (2012). Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 586, 1279-1286.
- Fung, M. K., Cheung, H. W., Ling, M. T., Cheung, A. L., Wong, Y. C., and Wang, X. (2006). Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Cancer* 95, 475-484.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K. H., and Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 62, 4899-4902.
- Gadducci, A., Cosio, S., Muraca, S., and Genazzani, A. R. (2002). Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* 23, 390-396.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., and Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31, 1869-1883.
- García-García, C., Ibrahim, Y. H., Serra, V., Calvo, M. T., Guzman, M., Grueso, J., Aura, C., Perez, J., Jessen, K., Liu, Y., *et al.* (2012). Dual mTORC1/2 and HER2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER2 therapy. *Clin Cancer Res* 18, 2603-2612.

- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* *11*, 495-505.
- Gayle, S. S., Arnold, S. L., O'Regan, R. M., and Nahta, R. (2012). Pharmacologic inhibition of mTOR improves lapatinib sensitivity in HER2-overexpressing breast cancer cells with primary trastuzumab resistance. *Anticancer Agents Med Chem* *12*, 151-162.
- Germà, J. R. (1991). Tumores germinales de testículo. Ediciones Doyma.
- Ghavamnasiri, M. R., Saeedi Saedi, H., Shahid Sales, S., and Ghafarzadegan, K. (2010). Clinical relevance of HER-2/neu overexpression in patients with testicular nonseminomatous germ cell tumor. *Urol J* *7*, 26-29.
- Grande, L., Bretones, G., Rosa-Garrido, M., Garrido-Martin, E. M., Hernandez, T., Fraile, S., Botella, L., de Alava, E., Vidal, A., Garcia del Muro, X., *et al.* (2012). Transcription factors Sp1 and p73 control the expression of the proapoptotic protein NOXA in the response of testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin. *J Biol Chem* *287*, 26495-26505.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* *16*, 1647-1655.
- Gregory, C. W., Whang, Y. E., McCall, W., Fei, X., Liu, Y., Ponguta, L. A., French, F. S., Wilson, E. M., and Earp, H. S., 3rd (2005). Heregulin-induced activation of HER2 and HER3 increases androgen receptor transactivation and CWR-R1 human recurrent prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res* *11*, 1704-1712.
- Grothey, A., Sugrue, M. M., Purdie, D. M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., and Kozloff, M. (2008). Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol* *26*, 5326-5334.
- Guerin, O., Formento, P., Lo Nigro, C., Hofman, P., Fischel, J. L., Etienne-Grimaldi, M. C., Merlano, M., Ferrero, J. M., and Milano, G. (2008). Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* *134*, 51-57.
- Guillou, L., Estreicher, A., Chaubert, P., Hurlimann, J., Kurt, A. M., Mettetz, G., Iggo, R., Gray, A. C., Jichlinski, P., Leisinger, H. J., and Benhattar, J. (1996). Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol* *149*, 1221-1228.
- Gutekunst, M., Oren, M., Weillbacher, A., Dengler, M. A., Markwardt, C., Thomale, J., Aulitzky, W. E., and van der Kuip, H. (2011). p53 hypersensitivity is the predominant mechanism of the unique responsiveness of testicular germ cell tumor (TGCT) cells to cisplatin. *PLoS One* *6*, e19198.
- Hafsi, S., Pezzino, F. M., Candido, S., Ligresti, G., Spandidos, D. A., Soua, Z., McCubrey, J. A., Travali, S., and Libra, M. (2011). Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int J Oncol* *40*, 639-644.
- Hammers, H. J., Verheul, H. M., Salumbides, B., Sharma, R., Rudek, M., Jaspers, J., Shah, P., Ellis, L., Shen, L., Paesante, S., *et al.* (2010). Reversible epithelial to mesenchymal transition and acquired resistance to sunitinib in patients with renal cell carcinoma: evidence from a xenograft study. *Mol Cancer Ther* *9*, 1525-1535.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hawkins, D. S., Demers, G. W., and Galloway, D. A. (1996). Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* *56*, 892-898.

- Hechelhammer, L., Storkel, S., Odermatt, B., Heitz, P. U., and Jochum, W. (2003). Epidermal growth factor receptor is a marker for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 443, 28-31.
- Hengstler, J. G., Lange, J., Kett, A., Dornhofer, N., Meinert, R., Arand, M., Knapstein, P. G., Becker, R., Oesch, F., and Tanner, B. (1999). Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 59, 3206-3214.
- Hervent, A. S., and De Keulenaer, G. W. (2012). Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity Induced by ErbB Receptor Inhibitor Cancer Therapeutics. *Int J Mol Sci* 13, 12268-12286.
- Hogan, B., Fellous, M., Avner, P., and Jacob, F. (1977). Isolation of a human teratoma cell line which expresses F9 antigen. *Nature* 270, 515-518.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., 3rd, and Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8933-8938.
- Holzer, A. K., Manorek, G. H., and Howell, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70, 1390-1394.
- Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A. J., Stoop, H., van Gorp, R. J., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J. T., Dinjens, W. N., *et al.* (2009). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27, 2129-2136.
- Huang, S., Li, C., Armstrong, E. A., Peet, C. R., Saker, J., Amler, L. C., Sliwkowski, M. X., and Harari, P. M. (2013). Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res* 73, 824-833.
- Huang, W. C., and Hung, M. C. (2009). Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J Formos Med Assoc* 108, 180-194.
- Huyghe, E., Matsuda, T., and Thonneau, P. (2003). Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 170, 5-11.
- Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-354.
- Hynes, N. E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21, 177-184.
- Ioannou, N., Seddon, A. M., Dalgleish, A., Mackintosh, D., and Modjtahedi, H. (2013). Treatment with a combination of the ErbB (HER) family blocker afatinib and the IGF-1R inhibitor, NVP-AEW541 induces synergistic growth inhibition of human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 13, 41.
- Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., and Tanaka, T. (2007). Differential regulation of the cytotoxicity activity of paclitaxel by orobol and platelet derived growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep* 18, 195-201.
- Issa, A., Gill, J. W., Heideman, M. R., Sahin, O., Wiemann, S., Dey, J. H., and Hynes, N. E. (2013). Combinatorial targeting of FGF and ErbB receptors blocks growth and metastatic spread of breast cancer models. *Breast Cancer Res* 15, R8.
- Itamochi, H., Kato, M., Nishimura, M., Oishi, T., Shimada, M., Sato, S., Naniwa, J., Nonaka, M., Kudoh, A., Terakawa, N., *et al.* (2012). Establishment and characterization of a novel ovarian serous adenocarcinoma cell line, TU-OS-4, that overexpresses EGFR and HER2. *Hum Cell* 25, 111-115.
- Jain, A., Brames, M. J., Vaughn, D. J., and Einhorn, L. H. (2013). Phase II Clinical Trial of Oxaliplatin and Bevacizumab in Refractory Germ Cell Tumors. *Am J Clin Oncol*.
- Janmaat, M. L., Kruyt, F. A., Rodriguez, J. A., and 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, 2316-2326.

- Junttila, T. T., Akita, R. W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G. D., Friedman, L. S., Sampath, D., and Sliwkowski, M. X. (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 15, 429-440.
- Kabbinavar, F. F., Hambleton, J., Mass, R. D., Hurwitz, H. I., Bergsland, E., and Sarkar, S. (2005). Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 3706-3712.
- Katan, M. (1998). Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1436, 5-17.
- Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y. M., Rochdi, M., and Howell, S. B. (2002). Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 62, 6559-6565.
- Kelland, L. R., Mistry, P., Abel, G., Freidlos, F., Loh, S. Y., Roberts, J. J., and Harrap, K. R. (1992). Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line. *Cancer Res* 52, 1710-1716.
- Kierszenbaum, A. L., and Tres, L. L. (2001). Primordial germ cell-somatic cell partnership: a balancing cell signaling act. *Mol Reprod Dev* 60, 277-280.
- Kim, W. Y., and Kaelin, W. G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22, 4991-5004.
- Klein, S., and Levitzki, A. (2009). Targeting the EGFR and the PKB pathway in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21, 185-193.
- Kluge, A., Dabir, S., Kern, J., Nethery, D., Halmos, B., Ma, P., and Dowlati, A. (2009). Cooperative interaction between protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-3 with epidermal growth factor receptor blockade in lung cancer. *Int J Cancer* 125, 1728-1734.
- Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G. B., Mendelsohn, J., and Fan, Z. (2003). HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22, 3205-3212.
- Koberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., and Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 1806, 172-182.
- Kodack, D. P., Chung, E., Yamashita, H., Incio, J., Duyverman, A. M., Song, Y., Farrar, C. T., Huang, Y., Ager, E., Kamoun, W., *et al.* (2012). Combined targeting of HER2 and VEGFR2 for effective treatment of HER2-amplified breast cancer brain metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3119-3127.
- Kollmannsberger, C., Honecker, F., and Bokemeyer, C. (2006). Treatment of germ cell tumors--update 2006. *Ann Oncol* 17 Suppl 10, x31-35.
- Kollmannsberger, C., Pressler, H., Mayer, F., Kanz, L., and Bokemeyer, C. (1999). Cisplatin-refractory, HER2/neu-expressing germ-cell cancer: induction of remission by the monoclonal antibody Trastuzumab. *Ann Oncol* 10, 1393-1394.
- Korkola, J. E., Houldsworth, J., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (2009). Molecular events in germ cell tumours: linking chromosome-12 gain, acquisition of pluripotency and response to cisplatin. *BJU Int* 104, 1334-1338.
- Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., van den Berg, A., Suurmeijer, A. J., Bischoff, R., Gietema, J. A., and de Jong, S. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* 120, 3594-3605.
- Kowanetz, M., and Ferrara, N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 12, 5018-5022.
- Koychev, D., Oechsle, K., Bokemeyer, C., and Honecker, F. (2011). Treatment of patients with relapsed and/or cisplatin-refractory metastatic germ cell tumours: an update. *Int J Androl* 34, e266-273.
- Krege, S., Beyer, J., Souchon, R., Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Cavallin-Stahl, E., *et al.* (2008). European consensus conference on

- diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): part II. *Eur Urol* 53, 497-513.
- Ksienski, D. (2010). Imatinib mesylate: past successes and future challenges in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Med Insights Oncol* 5, 365-379.
- Kumar, R., Crouthamel, M. C., Rominger, D. H., Gontarek, R. R., Tummino, P. J., Levin, R. A., and King, A. G. (2009). Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase angiogenesis inhibitors. *Br J Cancer* 101, 1717-1723.
- Kumar, R., Knick, V. B., Rudolph, S. K., Johnson, J. H., Crosby, R. M., Crouthamel, M. C., Hopper, T. M., Miller, C. G., Harrington, L. E., Onori, J. A., *et al.* (2007). Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* 6, 2012-2021.
- Kurman, R. J., Scardino, P. T., McIntire, K. R., Waldmann, T. A., and Javadpour, N. (1977). Cellular localization of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. *Cancer* 40, 2136-2151.
- La Vecchia, C., Bosetti, C., Lucchini, F., Bertuccio, P., Negri, E., Boyle, P., and Levi, F. (2010). Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 21, 1323-1360.
- Lai, S. Y., and Johnson, F. M. (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.
- Lau, C. K., Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Yeoh, G. C., Poon, R. T., and Fan, S. T. (2009). An Akt/hypoxia-inducible factor-1alpha/platelet-derived growth factor-BB autocrine loop mediates hypoxia-induced chemoresistance in liver cancer cells and tumorigenic hepatic progenitor cells. *Clin Cancer Res* 15, 3462-3471.
- Lebwohl, D., and Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 34, 1522-1534.
- Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., Sliwkowski, M. X., and Stern, H. M. (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 68, 5878-5887.
- Lee, C. M., Shrieve, D. C., Zempolich, K. A., Lee, R. J., Hammond, E., Handrahan, D. L., and Gaffney, D. K. (2005). Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 99, 415-421.
- Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.
- Lenferink, A. E., Simpson, J. F., Shawver, L. K., Coffey, R. J., Forbes, J. T., and Arteaga, C. L. (2000). Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase suppresses tumorigenesis in MMTV/Neu + MMTV/TGF-alpha bigenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9609-9614.
- Levina, V., Marrangoni, A. M., DeMarco, R., Gorelik, E., and Lokshin, A. E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One* 3, e3077.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Liu, L. Z., Zhou, X. D., Qian, G., Shi, X., Fang, J., and Jiang, B. H. (2007). AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer Res* 67, 6325-6332.
- Liu, Y., Zi, X., and Pollak, M. (2004). Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer* 108, 334-341.

- Madani, A., Kemmer, K., Sweeney, C., Corless, C., Ulbright, T., Heinrich, M., and Einhorn, L. (2003). Expression of KIT and epidermal growth factor receptor in chemotherapy refractory non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol* 14, 873-880.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Manova, K., Nocka, K., Besmer, P., and Bachvarova, R. F. (1990). Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110, 1057-1069.
- Masters, J. R., and Koberle, B. (2003). Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 517-525.
- Masters, J. R., Osborne, E. J., Walker, M. C., and Parris, C. N. (1993). Hypersensitivity of human testis-tumour cell lines to chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer* 53, 340-346.
- Matoska, J., Ondrus, D., and Hornak, M. (1988). Metastatic spermatocytic seminoma. A case report with light microscopic, ultrastructural, and immunohistochemical findings. *Cancer* 62, 1197-1201.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., *et al.* (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263-1284.
- McDonagh, C. F., Huhlov, A., Harms, B. D., Adams, S., Paragas, V., Oyama, S., Zhang, B., Luus, L., Overland, R., Nguyen, S., *et al.* (2012). Antitumor activity of a novel bispecific antibody that targets the ErbB2/ErbB3 oncogenic unit and inhibits heregulin-induced activation of ErbB3. *Mol Cancer Ther* 11, 582-593.
- McGlynn, K. A., and Cook, M. B. (2009). Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. *Future Oncol* 5, 1389-1402.
- McKay, M. M., and Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113-3121.
- McKendrick, J. J., Theaker, J., and Mead, G. M. (1991). Nonseminomatous germ cell tumor with very high serum human chorionic gonadotropin. *Cancer* 67, 684-689.
- McKenzie, F. R., and Pouyssegur, J. (1996). cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. cAMP-dependent protein kinase induces a temporal shift in growth factor-stimulated MAP kinases. *J Biol Chem* 271, 13476-13483.
- Mebratu, Y., and Tesfagzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168-1175.
- Mego, M., Reckova, M., Sycova-Mila, Z., Obertova, J., Brozmanova, K., Salek, T., and Mardiak, J. (2007). Bevacizumab in a growing teratoma syndrome. Case report. *Ann Oncol* 18, 962-963.
- Mellinghoff, I. K., Vivanco, I., Kwon, A., Tran, C., Wongvipat, J., and Sawyers, C. L. (2004). HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell* 6, 517-527.
- Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., *et al.* (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9, 327-337.
- Metzger, R., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., Lenz, H. J., Hayashi, K., Groshen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., *et al.* (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 16, 309-316.
- Mill, C. P., Zordan, M. D., Rothenberg, S. M., Settleman, J., Leary, J. F., and Riese, D. J., 2nd (2011). ErbB2 Is Necessary for ErbB4 Ligands to Stimulate Oncogenic Activities in Models of Human Breast Cancer. *Genes Cancer* 2, 792-804.

- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S. P., Munshi, N. C., Richardson, P. G., and Anderson, K. C. (2002). Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 21, 5673-5683.
- Moasser, M. M., Basso, A., Averbuch, S. D., and Rosen, N. (2001). The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 61, 7184-7188.
- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., Gallen, M., Marsters, S., Tsai, S. P., *et al.* (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 18, 221-223.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., *et al.* (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960-1966.
- Moroni, M., Veronese, S., Schiavo, R., Carminati, O., Sorensen, B. S., Gambacorta, M., and Siena, S. (2001). Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 7, 2770-2775.
- Moserle, L., and Casanovas, O. (2013). Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance. *J Intern Med* 273, 128-137.
- Motzer, R. J., Dmitrovsky, E., Miller, W. H., Jr., Tong, W. P., Bajorin, D. F., Scher, H. I., and Bost, G. J. (1993). Suramin for germ cell tumors. In vitro growth inhibition and results of a phase II trial. *Cancer* 72, 3313-3317.
- Moulder, S. L., Yakes, F. M., Muthuswamy, S. K., Bianco, R., Simpson, J. F., and Arteaga, C. L. (2001). Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61, 8887-8895.
- Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T., *et al.* (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6, 117-127.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G. A., Wimley, W. C., Marrero, L., Sartor, C. I., Tovey, S., Cooke, T. G., Bartlett, J. M., and Jones, F. E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 6412-6420.
- Nathanson, K. L., Kanetsky, P. A., Hawes, R., Vaughn, D. J., Letrero, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K. A., Hogg, D., Jewett, M. A., *et al.* (2005). The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet* 77, 1034-1043.
- Naumov, G. N., Nilsson, M. B., Cascone, T., Briggs, A., Straume, O., Akslén, L. A., Lifshits, E., Byers, L. A., Xu, L., Wu, H. K., *et al.* (2009). Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 15, 3484-3494.
- NCI ([updated 1/2011-cited 4/2013]-a). FDA Approval for Lapatinib Ditosylate. National Cancer Institute website: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-lapatinib>.
- NCI ([updated 1/2011-cited 4/2013]-b). FDA Approval for Panitumumab. National Cancer Institute website available: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-panitumumab>.
- NCI ([updated 1/2013-cited 4/2013]). FDA Approval for Bevacizumab. National Cancer Institute website: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab>.
- NCI ([updated 5/2011-cited 4/2013]). FDA Approval for Sunitinib Malate. National Cancer Institute website: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sunitinib-malate>.
- NCI ([updated 7/2012-cited 4/2013]). FDA Approval for Cetuximab. National Cancer Institute website: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-cetuximab>.

- NCI ([updated 11/2010-cited 4/2013]). FDA Approval for Sorafenib Tosylate. National Cancer Institute website: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sorafenib-tosylate>.
- Neve, R. M., Sutterluty, H., Pullen, N., Lane, H. A., Daly, J. M., Krek, W., and Hynes, N. E. (2000). Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* *19*, 1647-1656.
- Nitzsche, B., Gloesenkamp, C., Schrader, M., Ocker, M., Preissner, R., Lein, M., Zakrzewicz, A., Hoffmann, B., and Hopfner, M. (2010). Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* *103*, 18-28.
- Noel, E. E., Perry, J., Chaplin, T., Mao, X., Cazier, J. B., Joel, S. P., Oliver, R. T., Young, B. D., and Lu, Y. J. (2008). Identification of genomic changes associated with cisplatin resistance in testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* *47*, 604-613.
- O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., *et al.* (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* *57*, 4285-4300.
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., *et al.* (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* *66*, 1500-1508.
- Oechsle, K., Honecker, F., Cheng, T., Mayer, F., Czaykowski, P., Winkvist, E., Wood, L., Fenner, M., Glaesener, S., Hartmann, J. T., *et al.* (2011a). Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study. *Ann Oncol* *22*, 2654-2660.
- Oechsle, K., Kollmannsberger, C., Honecker, F., Mayer, F., Waller, C. F., Hartmann, J. T., Boehlke, I., and Bokemeyer, C. (2011b). Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors. *Eur Urol* *60*, 850-855.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., *et al.* (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* *64*, 6892-6899.
- Olaussen, K. A., Commo, F., TAILLIER, M., Lacroix, L., Vitale, I., Raza, S. Q., Richon, C., Dessen, P., Lazar, V., Soria, J. C., and Kroemer, G. (2009). Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* *28*, 4249-4260.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* *19*, 3159-3167.
- Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martin, A., Martin-Castillo, B., Perez-Martinez, M. C., Cufi, S., Del Barco, S., Bernado, L., Brunet, J., Lopez-Bonet, E., and Menendez, J. A. (2010). Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol* *37*, 669-678.
- Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* *5*, 210-222.
- Osusky, K. L., Hallahan, D. E., Fu, A., Ye, F., Shyr, Y., and Geng, L. (2004). The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels. *Angiogenesis* *7*, 225-233.
- Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* *15*, 220-231.

- Pan, Y., Xu, Y., Feng, S., Luo, S., Zheng, R., Yang, J., Wang, L., Zhong, L., Yang, H. Y., Wang, B. L., *et al.* (2012). SKLB1206, a novel orally available multikinase inhibitor targeting EGFR activating and T790M mutants, ErbB2, ErbB4, and VEGFR2, displays potent antitumor activity both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 11, 952-962.
- Pao, W., Wang, T. Y., Riely, G. J., Miller, V. A., Pan, Q., Ladanyi, M., Zakowski, M. F., Heelan, R. T., Kris, M. G., and Varmus, H. E. (2005). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2, e17.
- Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2011). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9-22.
- Pectasides, D., Nikolaou, M., Pectasides, E., Koumariou, A., Valavanis, C., and Economopoulos, T. (2008). Complete response after imatinib mesylate administration in a patient with chemoresistant stage IV seminoma. *Anticancer Res* 28, 2317-2320.
- Pedersini, R., Vattemi, E., Mazzoleni, G., and Graiff, C. (2007). Complete response after treatment with imatinib in pretreated disseminated testicular seminoma with overexpression of c-KIT. *Lancet Oncol* 8, 1039-1040.
- Peng, H. Q., Hogg, D., Malkin, D., Bailey, D., Gallie, B. L., Bulbul, M., Jewett, M., Buchanan, J., and Goss, P. E. (1993). Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 53, 3574-3578.
- Pera, M. F., Blasco Lafita, M. J., and Mills, J. (1987). Cultured stem-cells from human testicular teratomas: the nature of human embryonal carcinoma, and its comparison with two types of yolk-sac carcinoma. *Int J Cancer* 40, 334-343.
- Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M., Cui, W., and Pelling, J. C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5, 1007-1014.
- Pfister, D., Richter, S., Thuer, D., Giedl, J., Heidenreich, A., and Klotz, T. (2010). Her-2/neu expression in testicular cancer--a retrospective analysis in 57 cases. *Urology* 76, 1266 e1266-1269.
- Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316, 1324-1331.
- Piulats, J. M., Jimenez, L., Garcia del Muro, X., Villanueva, A., Vinals, F., and Germa-Lluch, J. R. (2009). Molecular mechanisms behind the resistance of cisplatin in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol* 11, 780-786.
- Podar, K., Tonon, G., Sattler, M., Tai, Y. T., Legouill, S., Yasui, H., Ishitsuka, K., Kumar, S., Kumar, R., Pandite, L. N., *et al.* (2006). The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19478-19483.
- Pogribny, I. P., Filkowski, J. N., Tryndyak, V. P., Golubov, A., Shpyleva, S. I., and Kovalchuk, O. (2010). Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* 127, 1785-1794.
- Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R. L., and Kohn, K. W. (2004). Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23, 2934-2949.
- Pratilas, C. A., and Solit, D. B. (2010). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res* 16, 3329-3334.
- Quesnelle, K. M., and Grandis, J. R. (2011). Dual kinase inhibition of EGFR and HER2 overcomes resistance to cetuximab in a novel in vivo model of acquired cetuximab resistance. *Clin Cancer Res* 17, 5935-5944.
- Rini, B., and Al-Marrawi, M. Y. (2011). Pazopanib for the treatment of renal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 12, 1171-1189.
- Rini, B. I., and Small, E. J. (2005). Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 23, 1028-1043.

- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A., and Arteaga, C. L. (2007). Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 13, 4909-4919.
- Rosen, A., Jayram, G., Drazer, M., and Eggner, S. E. (2011). Global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur Urol* 60, 374-379.
- Ross, J. H., Rybicki, L., and Kay, R. (2002). Clinical behavior and a contemporary management algorithm for prepubertal testis tumors: a summary of the Prepubertal Testis Tumor Registry. *J Urol* 168, 1675-1678; discussion 1678-1679.
- Rossi, P., Albanesi, C., Grimaldi, P., and Geremia, R. (1991). Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 910-914.
- Rudloff, U., and Samuels, Y. (2010). A growing family: adding mutated Erbb4 as a novel cancer target. *Cell Cycle* 9, 1487-1503.
- Rugo, H. S., Herbst, R. S., Liu, G., Park, J. W., Kies, M. S., Steinfeldt, H. M., Pithavala, Y. K., Reich, S. D., Freddo, J. L., and Wilding, G. (2005). Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 23, 5474-5483.
- Salmena, L., Carracedo, A., and Pandolfi, P. P. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133, 403-414.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.
- Sanchez-Martin, M., and Pandiella, A. (2012). Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *Int J Cancer* 131, 244-252.
- Santarpia, L., Lippman, S. M., and El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16, 103-119.
- Schmoll, H. J., Jordan, K., Huddart, R., Laguna, M. P., Horwich, A., Fizazi, K., and Kataja, V. (2009a). Testicular non-seminoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 89-96.
- Schmoll, H. J., Jordan, K., Huddart, R., Laguna, M. P., Horwich, A., Fizazi, K., and Kataja, V. (2009b). Testicular seminoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 83-88.
- Schoeberl, B., Faber, A. C., Li, D., Liang, M. C., Crosby, K., Onsum, M., Burenkova, O., Pace, E., Walton, Z., Nie, L., *et al.* (2010). An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res* 70, 2485-2494.
- Schoeberl, B., Pace, E. A., Fitzgerald, J. B., Harms, B. D., Xu, L., Nie, L., Linggi, B., Kalra, A., Paragas, V., Bukhalid, R., *et al.* (2009). Therapeutically targeting ErbB3: a key node in ligand-induced activation of the ErbB receptor-PI3K axis. *Sci Signal* 2, ra31.
- Schutz, F. A., Choueiri, T. K., and Sternberg, C. N. (2010). Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug. *Crit Rev Oncol Hematol* 77, 163-171.
- Schweyer, S., Soruri, A., Meschter, O., Heintze, A., Zschunke, F., Miosge, N., Thelen, P., Schlott, T., Radzun, H. J., and Fayyazi, A. (2004). Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br J Cancer* 91, 589-598.
- Sergina, N. V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., and Moasser, M. M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445, 437-441.
- Servidei, T., Riccardi, A., Mozzetti, S., Ferlini, C., and Riccardi, R. (2008). Chemoresistant tumor cell lines display altered epidermal growth factor receptor and HER3 signaling and enhanced sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer* 123, 2939-2949.
- Servidei, T., Riccardi, A., Sanguinetti, M., Dominici, C., and Riccardi, R. (2006). Increased sensitivity to the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor inhibitor STI571 in

- chemoresistant glioma cells is associated with enhanced PDGF-BB-mediated signaling and STI571-induced Akt inactivation. *J Cell Physiol* 208, 220-228.
- Seshagiri, S., Stawiski, E. W., Durinck, S., Modrusan, Z., Storm, E. E., Conboy, C. B., Chaudhuri, S., Guan, Y., Janakiraman, V., Jaiswal, B. S., *et al.* (2012). Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 488, 660-664.
- Shachar, S., Ziv, O., Avkin, S., Adar, S., Wittschieben, J., Reissner, T., Chaney, S., Friedberg, E. C., Wang, Z., Carell, T., *et al.* (2009). Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J* 28, 383-393.
- Sheikine, Y., Genega, E., Melamed, J., Lee, P., Reuter, V. E., and Ye, H. (2012). Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res* 2, 153-167.
- Sheng, Q., Liu, X., Fleming, E., Yuan, K., Piao, H., Chen, J., Moustafa, Z., Thomas, R. K., Greulich, H., Schinzel, A., *et al.* (2010). An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports *in vivo* proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 17, 298-310.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279.
- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, 8017-8023.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and *et al.* (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., *et al.* (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12, 5064-5073.
- Somlo, G., Martel, C. L., Lau, S. K., Frankel, P., Ruel, C., Gu, L., Hurria, A., Chung, C., Luu, T., Morgan, R., Jr., *et al.* (2012). A phase I/II prospective, single arm trial of gefitinib, trastuzumab, and docetaxel in patients with stage IV HER-2 positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 131, 899-906.
- Song, L., Turkson, J., Karras, J. G., Jove, R., and Haura, E. B. (2003). Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene* 22, 4150-4165.
- Stein, W. D., Yang, J., Bates, S. E., and Fojo, T. (2008). Bevacizumab reduces the growth rate constants of renal carcinomas: a novel algorithm suggests early discontinuation of bevacizumab resulted in a lack of survival advantage. *Oncologist* 13, 1055-1062.
- Stordal, B., Pavlakis, N., and Davey, R. (2007). Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 33, 347-357.
- Subramaniam, A., Shanmugam, M. K., Perumal, E., Li, F., Nachiyappan, A., Dai, X., Swamy, S. N., Ahn, K. S., Kumar, A. P., Tan, B. K., *et al.* (2012). Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1835, 46-60.
- Sunpaweravong, P., Sunpaweravong, S., Puttawibul, P., Mitarnun, W., Zeng, C., Baron, A. E., Franklin, W., Said, S., and Varella-Garcia, M. (2005). Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 111-119.
- Tabara, K., Kanda, R., Sonoda, K., Kubo, T., Murakami, Y., Kawahara, A., Azuma, K., Abe, H., Kage, M., Yoshinaga, A., *et al.* (2012). Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS One* 7, e41017.

- Takeuchi, K., and Ito, F. (2010). EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. *FEBS J* 277, 316-326.
- Tanner, B., Hasenclever, D., Stern, K., Schormann, W., Bezler, M., Hermes, M., Brulport, M., Bauer, A., Schiffer, I. B., Gebhard, S., *et al.* (2006). ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 24, 4317-4323.
- Thybusch-Bernhardt, A., Beckmann, S., and Juhl, H. (2001). Comparative analysis of the EGF-receptor family in pancreatic cancer: expression of HER-4 correlates with a favourable tumor stage. *Int J Surg Investig* 2, 393-400.
- Toyoda-Ohno, H., Obinata, M., and Matsui, Y. (1999). Members of the ErbB receptor tyrosine kinases are involved in germ cell development in fetal mouse gonads. *Dev Biol* 215, 399-406.
- Ulahannan, S. V., and Brahmer, J. R. (2011). Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 29, 325-337.
- Ulbright, T. M., and Roth, L. M. (1987). Recent developments in the pathology of germ cell tumors. *Semin Diagn Pathol* 4, 304-319.
- Varmus, H., and Harlow, E. (2012a). ProvocativeQuestions. <http://provocativequestionsncin.nih.gov/>.
- Varmus, H., and Harlow, E. (2012b). Science funding: Provocative questions in cancer research. *Nature* 481, 436-437.
- Vaught, D. B., Stanford, J. C., Young, C., Hicks, D. J., Wheeler, F., Rinehart, C., Sanchez, V., Koland, J., Muller, W. J., Arteaga, C. L., and Cook, R. S. (2012). HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation. *Cancer Res* 72, 2672-2682.
- Vermeij, J., Teugels, E., Bourgain, C., Xiangming, J., in 't Veld, P., Ghislain, V., Neyns, B., and De Greve, J. (2008). Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 8, 3.
- Viglietto, G., Romano, A., Maglione, D., Rambaldi, M., Paoletti, I., Lago, C. T., Califano, D., Monaco, C., Mineo, A., Santelli, G., *et al.* (1996). Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene* 13, 577-587.
- Vignais, M. L., Sadowski, H. B., Watling, D., Rogers, N. C., and Gilman, M. (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol* 16, 1759-1769.
- Vinals, F., and Pouyssegur, J. (2001). Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol* 21, 7218-7230.
- Vlacich, G., and Coffey, R. J. (2011). Resistance to EGFR-targeted therapy: a family affair. *Cancer Cell* 20, 423-425.
- Vogelzang, N. J., Bronson, D., Savino, D., Vessella, R. L., and Fraley, E. F. (1985). A human embryonal-yolk sac carcinoma model system in athymic mice. *Cancer* 55, 2584-2593.
- Voigt, W., Kegel, T., Maher, G., Jordan, K., Muller, L., and Schmoll, H. J. (2006). Bevacizumab plus high-dose ifosfamide, etoposide and carboplatin (HD-ICE) as third-line salvage chemotherapy induced an unexpected dramatic response in highly platinum refractory germ-cell cancer. *Ann Oncol* 17, 531-533.
- Vugrin, D., Chen, A., Feigl, P., and Laszlo, J. (1988). Embryonal carcinoma of the testis. *Cancer* 61, 2348-2352.
- Wahab-Wahlgren, A., Martinelle, N., Holst, M., Jahnukainen, K., Parvinen, M., and Soder, O. (2003). EGF stimulates rat spermatogonial DNA synthesis in seminiferous tubule segments in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 201, 39-46.
- Walker, M. C., Povey, S., Parrington, J. M., Riddle, P. N., Knuechel, R., and Masters, J. R. (1990). Development and characterization of cisplatin-resistant human testicular and bladder tumour cell lines. *Eur J Cancer* 26, 742-747.

- Wang, K., Zhuang, Y., Liu, C., and Li, Y. (2012). Inhibition of c-Met activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling. *Arch Biochem Biophys* 526, 38-43.
- Wang, X., Martindale, J. L., and Holbrook, N. J. (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 39435-39443.
- Ward, J. E., and Stadler, W. M. (2010). Pazopanib in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 16, 5923-5927.
- Wehrman, T. S., Raab, W. J., Casipit, C. L., Doyonnas, R., Pomerantz, J. H., and Blau, H. M. (2006). A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19063-19068.
- Weinstein, I. B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63-64.
- Wheeler, D. L., Dunn, E. F., and Harari, P. M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 493-507.
- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R. A., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 835-844.
- Williams, P., R., W., and Gray. (1985). *Gray Anatomy*. Ed Salvat.
- Winter, C., and Albers, P. (2010). Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 7, 43-53.
- Wood, E. R., Truesdale, A. T., McDonald, O. B., Yuan, D., Hassell, A., Dickerson, S. H., Ellis, B., Pennisi, C., Horne, E., Lackey, K., *et al.* (2004). A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64, 6652-6659.
- [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ErbB3) (Website Updated 2012 Aug., cited 2013 Mar.18.). Available from <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ErbB3>.
- Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J. J., O'Donnell, J. D., Wang, J., Wenham, R. M., Coppola, D., Kruk, P. A., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2008). MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 68, 425-433.
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., *et al.* (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 3, 99ra86.
- Yuan, T. L., and Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.
- Zhang, D., Pal, A., Bornmann, W. G., Yamasaki, F., Esteva, F. J., Hortobagyi, G. N., Bartholomeusz, C., and Ueno, N. T. (2008). Activity of lapatinib is independent of EGFR expression level in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7, 1846-1850.
- Zhang, F., Yang, Y., Smith, T., Kau, S. W., McConathy, J. M., Esteva, F. J., Kuerer, H. M., Symmans, W. F., Buzdar, A. U., Hortobagyi, G. N., and Pusztai, L. (2003). Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97, 1758-1765.
- Zhao, G., Cai, C., Yang, T., Qiu, X., Liao, B., Li, W., Ji, Z., Zhao, J., Zhao, H., Guo, M., *et al.* (2013). MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PLoS One* 8, e53906.

PUBLICACIONS

A continuació adjuntem la publicació generada d'aquesta tesi doctoral.

Juliachs, M. *et al.* **The PDGFR β -AKT Pathway Contributes To CDDP-Acquired Resistance In Testicular Germ Cell Tumors.** (November 25, 2013) *Clin. Cancer Res.* Published OnlineFirst. 10.1158/1078-0432.CCR-13-1131.

Juliachs, M. *et al.* **Effectivity of pazopanib treatment in orthotopic models of human testicular germ cell tumors.** *BMC Cancer.* 2013. 13: p.382.

Juliachs, M. *et al.* **ErbBs inhibition by lapatinib blocks tumor growth in an orthotopic model of human testicular germ cell tumor.** *Int. J. Cancer.* 2013. 133(1): p.235-46.