




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

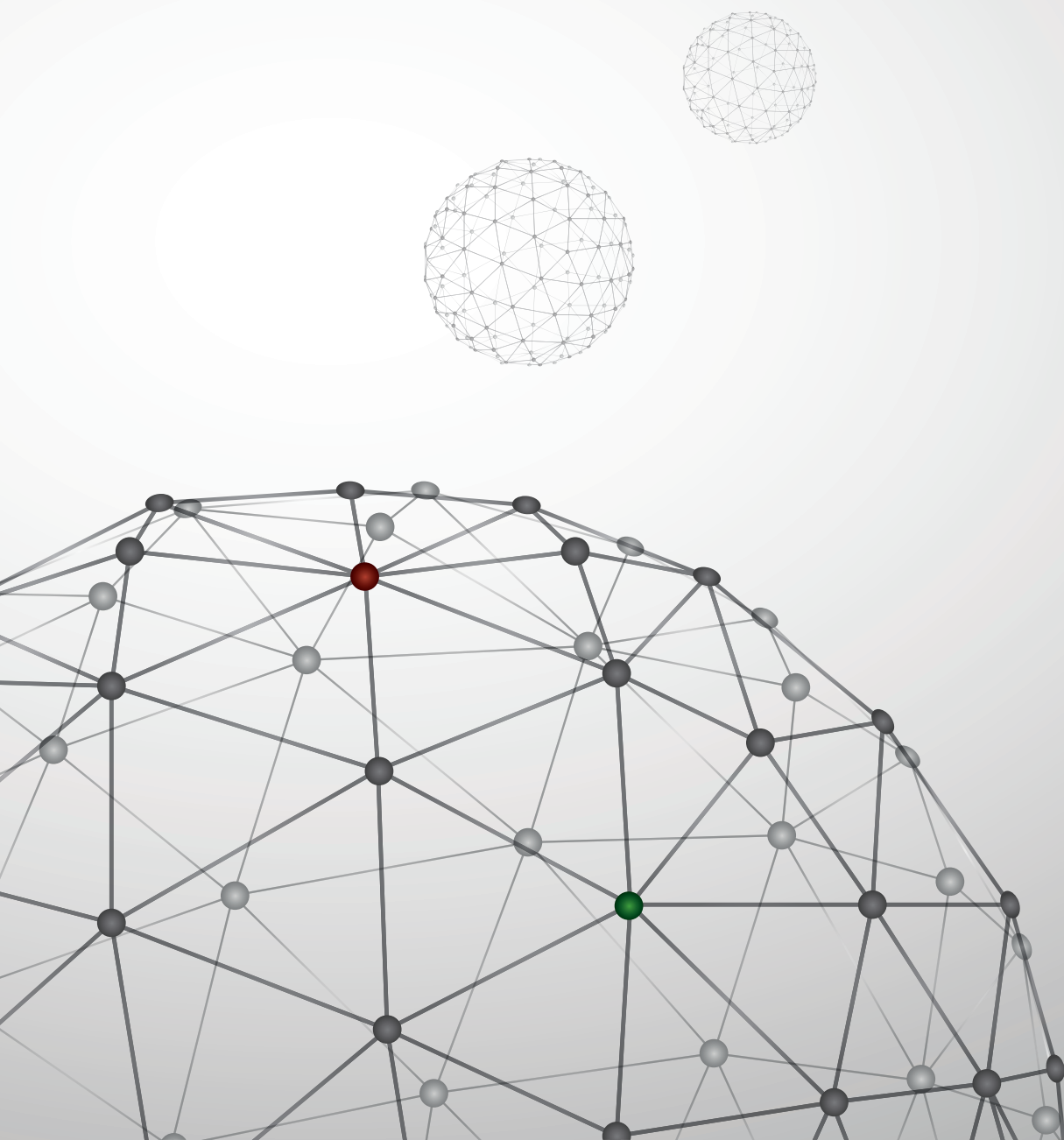
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Joan Repullés Fernández
Tesi doctoral · Octubre 2017



Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Joan Repullés Fernández

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor en
Biologia cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Directores:

Dra Mariona Terradas Ill i Dra Anna Genescà Garrigosa

La **Dra. Mariona Terradas III**, investigadora del departament de Càncer hereditari de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge,
i la **Dra. Anna Genescà Garrigosa**, catedràtica del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia a la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Joan Repullés Fernández** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa a la memòria titulada "**Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular**" per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per que així consti, firmen el present certificat.

Dra. Mariona Terradas III

Dra Anna Genescà Garrigosa

Joan Repullés Fernández

Bellaterra, 19 de setembre de

Índex

Resum	1
Summary	3
Abreviatures	5
Introducció	9
Glàndula mamària	11
Anatomia i desenvolupament	11
Cèl·lules epitelials mamàries	13
Càncer de mama	15
Fonaments del càncer	15
Característiques de les cèl·lules tumorals	16
Classificacions del càncer de mama	19
Models de transformació	21
Tests per estudiar la tumorigènesi	24
Radiació ionitzant	29
Fonament	30
Diagnòstic i tractament	31
Controvèrsia	32
Hipòtesi i objectius	37
Hipòtesi de l'estudi	39
Objectius	39

Material i mètodes	41
Cultiu primari de cèl·lules epitelials mamàries	43
Procés de derivació	43
Cultiu de les BPEC	44
Medis de cultiu	45
Disseny i producció de partícules lentivirals	46
Clonació dels transgens <i>Ttag</i> i <i>hTERT</i> en vectors lentivirals	48
Extracció i purificació del vector lentiviral HRasV12	52
Producció de partícules lentivirals	53
Model de transformació experimental	54
Infeccions amb partícules lentivirals	54
Selecció del cultiu infectat	54
Comprovació de les infeccions	55
Irradiació dels cultius	58
Caracterització dels cultius	58
Corbes de creixement	59
Quantificació dels nivells de proteïna	59
Anàlisis citogenètiques	61
Recompte de cèl·lules amb característiques mioepitelials i luminals	62
Mort radioinduída	63
Anàlisi del perfil d'expressió gènica (PAM50)	64
Preparació de les mostres	64
Interpretació resultats	65
Cultius tridimensionals en Matrigel	65
Sembra i cultiu	66
Valoració del creixement i el nombre dels acini formats	66
Detecció immunofluorescent de proteïnes en cultius tridimensionals	67
Valoració de les immunofluorescències en cultius tridimensionals	68
Test de creixement independent d'ancoratge	69
Sembra i cultiu	69
Identificació, recompte i mesura de colònies	70
Anàlisis estadístiques	72

Resultats	75
Establiment i caracterització dels cultius	77
Establiment dels cultius primaris	77
Creixement i transducció de les BPECs	79
Caracterització dels diferents cultius cel·lulars	81
Test de creixement independent d'ancoratge	87
Creixement en agar del model cel·lular d'experimentació	87
Creixement en agar de les cèl·lules irradiades	90
Cultiu tridimensional en Matrigel	101
Formació dels acini	101
Creixement en cultiu tridimensional del model cel·lular d'experimentació	103
Creixement en cultiu tridimensional de les mostres irradiades	104
Polaritat dels acini	110
Perfil d'expressió gènica	114
Resultats del PAM50	114
Efecte de la transducció sobre l'expressió gènica dels biomarcadors	117
Efecte de la radiació sobre l'expressió gènica	122
Discussió	125
Obtenció i cultiu de les BPEC	127
Establiment del model de transformació	131
Característiques de les cèl·lules transduïdes amb <i>Ttag</i> i <i>hTERT</i>	133
Característiques de les cèl·lules transduïdes amb <i>Ttag</i> , <i>hTERT</i> i <i>HRAS</i>	134
Efecte de la radiació sobre el procés de transformació experimental	138
Efecte de la radiació sobre les cèl·lules no transduïdes	138
Efecte de la radiació sobre les cèl·lules transduïdes amb <i>Ttag</i> i <i>hTERT</i>	140
Augment de la susceptibilitat de les cèl·lules transduïdes amb <i>Ttag</i> i <i>hTERT</i>	142
Conclusions	147
Bibliografia	151
Annex	167

Resum

La radiació s'utilitza actualment en múltiples procediments tant amb finalitats medico-diagnòstiques com de tractament. Tanmateix, l'exposició a radiació ionitzant pot causar l'acumulació de mutacions al DNA de les cèl·lules irradiades que poden promoure la tumorigènesi. La transformació tumoral és un procés que en alguns casos pot durar dècades abans no es manifesti, existint estadis intermedis on el procés de transformació s'ha iniciat però encara no ha donat lloc a cèl·lules capaces de formar un tumor. En aquest sentit, en la present tesi doctoral es pretén investigar l'efecte de radiació ionitzant sobre cèl·lules epitelials mamàries humanes sanes i parcialment transformades.

La glàndula mamària és un òrgan sovint exposat a radiació ionitzant i un dels teixits que permet amb més facilitat l'obtenció de teixit sa per finalitats experimentals. Per tal d'estudiar l'efecte de la radiació sobre les cèl·lules epitelials mamàries s'han derivat cultius primaris de BPECs (*Breast Primary Epithelial Cells*) a partir de teixit mamari sa provinent de dues donants. Un cop establert el cultiu, s'ha modificat el genoma d'aquestes cèl·lules de forma dirigida transduint-les amb els elements gènics *Ttag* i *hTERT* per obtenir cèl·lules en procés de transformació, i amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* per tal de transformar-les completament de forma experimental. Un cop establerts i caracteritzats, els cultius s'han exposat a dosis de radiació ionitzant d'entre 0,25 i 2 Gy i s'ha valorat l'adquisició de característiques tumorals degudes a l'exposició a la radiació. Concretament, s'ha estudiat l'efecte de radiació en la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge, la formació d'estructures organitzades en cultius tridimensionals en Matrigel i el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules sanes i parcialment transformades.

Les cèl·lules parcialment transformades van presentar un increment de la capacitat de formar colònies en agar 8 setmanes després d'irradiar-les amb 0,5 Gy o 2 Gy, en funció de la donant. En una de les dues donants també es va observar una disminució de la capacitat de formar estructures tridimensionals polaritzades per part de les cèl·lules parcialment transformades i irradiades. En conjunt, els resultats obtinguts han demostrat una resposta amb diferent grau de sensibilitat per part dels cultius derivats de les dues donants analitzades, suggerint possibles diferències interindividuais davant la resposta a la radiació. De manera més important, en les dues donants es va observar una major susceptibilitat davant la transformació radioinduída per

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

part d'aquelles cèl·lules que havien iniciat el procés de transformació de forma experimental, requerint menys dosi que les cèl·lules no transduïdes.

Summary

Ionizing radiation is used in multiple procedures as a therapeutic and diagnostic tool. However, ionizing radiation can induce mutations in the DNA of irradiated cells that can promote tumorigenesis. As malignant transformation is a process that takes many years, there are intermediate stages of cells that have initiated the process but haven't evolved into cancer yet. For this reason, the study here presented aims to investigate the effect of ionizing radiation on normal and partially-transformed human mammary epithelial cells.

The mammary gland is an organ that is often exposed to ionizing radiation and, due to the resection of part of the gland for esthetical reasons, it is easily used to obtain normal tissue for research purposes. To investigate the effect of ionizing radiation on human mammary epithelial cells, Breast Primary Epithelial Cells (BPECs) were derived from normal breast tissue from two different donors. Once the cultures were established, BPECs genome was modified by the transduction of *Ttag* and *hTERT* to obtain partially-transformed cells and with *Ttag*, *hTERT* and *HRAS* to completely and experimentally transform them. After their characterization, cells were exposed to different doses of ionizing radiation ranging from 0.25 to 2 Gy and the acquisition of radiation-induced tumoural features were analysed. Specifically, anchorage-independent growth assay, three-dimensional cell culture with Matrigel and gene expression profiling were used to analyse the effect of ionizing radiation on normal and partially-transformed cells.

Partially-transformed BPECs showed an increased soft-agar colony formation capacity 8 weeks after exposure to 0.5 or 2 Gy of γ -rays depending on the donor. In one of the donors, the capacity of polarized three-dimensional structures formation was reduced in partially-transformed cells exposed to radiation. Altogether, the results here obtained show that cells obtained from different donors have a different degree of sensitivity in the response to radiation; and more importantly, in both donors, a higher sensitivity to the radiation-induced cell transformation process is observed in those cells that have already initiated the process compared to normal cells, which require higher doses of radiation to complete the transformation process.

Abreviatures

- 2D/3D: 2 dimensions / 3 dimensions
- AA: Assaig de creixement independent d'ancoratge (de l'anglès *Anchorage Assay*).
- BPECs: *Breast Primary Epithelial Cells*
- BSA: Sèrum d'albumina bovina (de l'anglès *Bovine Serum Albumin*)
- cDNA: DNA complementari
- Cl: Claudina
- Cq: Cicle de quantificació (de l'anglès *Quantification Cycle*)
- DNasa: Desoxirribonucleasa
- MUC1: Mucina 1 o CD227
- mChFP: Proteïna fluorescent mCherry (de l'anglès *mCherry Fluorescent Protein*)
- CMV: Citomegalovirus
- DMSO: Dimetilsulfòxid
- DNA: Àcid desoxiribonucleic (de l'anglès *Deoxyribonucleid Acid*)
- ECM: Matriu extracel·lular (de l'anglès *Extracellular matrix*)
- EDTA: L'àcid etilendiamintetraacètic
- EGF: Factor de creixement epidermal (de l'anglès *Epidermal growth factor*)
- EGFR: Receptor del factor de creixement epidermal (de l'anglès *Epidermal Growth Factor Receptor*)
- ER: Receptor d'estrògens (de l'anglès *Estrogen Receptor*)
- FACS: Separació cel·lular per citometria de fluxe (de l'anglès *Fluorescence activated cell sorting*)
- FBS: Sèrum boví fetal (de l'anglès *Fetal Bovine Serum*)
- FC: *Fold Change*
- GFP: Proteïna fluorescent verda (de l'anglès *Green fluorescent protein*)
- HER2: Receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (de l'anglès *Epidermal growth factor receptor 2*)
- HMECs Cèl·lules epitelials mamàries humanes (de l'anglès *Human Mammary Epithelial Cells*)
- HRP: (de l'anglès *Horseradish Peroxidase*)
- IR: Radiació ionitzant (de l'anglès *Ionizing Radiation*)
- IRES: Lloc d'unió a ribosoma (de l'anglès *Internal Ribosome Entry Site*)
- IGF1: Factor de creixement insulínic tipus 1 (de l'anglès *Insulin-like growth factor 1*)
- K: Citoqueratina
- LET: Transferència lineal d'energia (de l'anglès *Linear Energy Transfer*)

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

LNT:	<i>Linear Non-Threshold</i>
MOI:	Nombre de partícules virals per cèl·lula (de l'anglès <i>Multiplicity Of Infection</i>)
MTT :	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
OIS:	Senescència induïda per oncogen (de l'anglès <i>Oncogene Induced Senescence</i>).
OMS:	Organització Mundial de la Salut
PAM50:	<i>Prediction Analysis of Microarray</i>
PET:	Tomografia per emissió de positrons (de l'anglès <i>Positron Emission Tomography</i>)
PBS:	Tampó fosfat salí (de l'anglès <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PD:	<i>Population Doubling</i>
PR:	Receptor de progesterona (de l'anglès <i>Progesterone Receptor</i>)
pRRL:	Vector lentiviral de tercera generació
pRb:	Retinoblastoma
PCR:	Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR:	PCR quantitativa (de l'anglès <i>Real-time quantitative PCR</i>)
RFU:	Unitats de Fluorescència Relativa (de l'anglès <i>Relative Fluorescence Unit</i>)
RNA:	Àcid Ribonucleic (de l'anglès <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNase:	Ribonucleasa
SMA:	Actina del múscle llis (de l'anglès <i>Smooth Muscle Actin</i>)
SV40:	Virus de simi 40
TAE:	Tris Acetat EDTA
TTBS:	PBS amb Tris i Tween 20
TEB:	<i>Terminal End Bud</i>
Ttag:	Antigen <i>Large T</i> i <i>small t</i> del virus de simi 40 (SV40).
TUNEL:	Marcatge dels terminals hidroxil dels àcids nucleïcs (de l'anglès <i>Transferase dUTP nick end labeling</i>)
uv	Ultraviolada
NGS:	Sèrum de cabra (de l'anglès <i>Normal Goat Serum</i>)
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
ROR:	Risc de recaiguda (de l'anglès <i>Risk Of Relapse</i>)

Introducció

Glàndula mamària

La mama és una glàndula sudorípara apocrina modificada (Ofstedal, 2002) que distingeix els mamífers de la resta d'animals (Macías i Hinck, 2013). La seva principal funció és la producció i secreció de llet per tal d'alimentar les cries després del part (Hassiotou i Geddes, 2013). Degut a la seva estreta relació amb la reproducció, la glàndula mamària pateix multitud de canvis hormonals, morfològics i estructurals al llarg de les diferents etapes del desenvolupament (Russo i Russo, 2004) que la fan susceptible a esdeveniments neoplàsics.

Anatomia i desenvolupament

La glàndula mamària es caracteritza per situar-se sobre la caixa toràcica cobrint part dels músculs pectorals i abdominals. El teixit mamari està envoltat per una fina capa de pell i es compon d'uns 15–20 lòbuls envoltats de teixit adipós (Figura 1A). Cadascun d'aquests lòbuls es divideix en 20–40 lobulets formats per glàndules tubuloalveolars ramificades. Aquestes convergeixen als túbuls galactòfors per finalment desembocar al mugró (Pandya i Moore, 2011). La irrigació sanguínia que rep la mama és predominantment a través dels vasos sanguinis toràcics interns i laterals (Figura 1B); mentre que el drenatge limfàtic que envolta la glàndula mamària és principalment subclavicular, toràcic i axil·lar (Figura 1C).

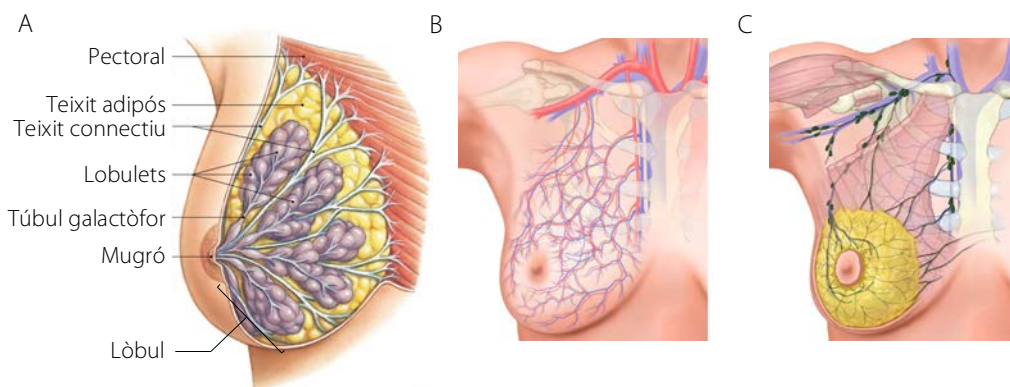


Figura 1. Anatomia de la glàndula mamària. A. Esquema de la secció transversal de la glàndula mamària on s'hi observen els lòbuls envoltats de teixit adipós. B. Esquema de la irrigació sanguínia de la glàndula mamària. C. Esquema del sistema limfàtic que drena la glàndula mamària. Imatges modificades de (Martini i Bartholomew, 2013; Jesinger, 2014).

El desenvolupament de la glàndula mamària s'inicia durant la vida embrionària amb la formació de les crestes mamàries (Howard i Gusterson, 2012). A la pubertat es produeix la segona etapa del desenvolupament en què es formen les estructures tubulars a partir de les protuberàncies

presentes al seus extrems (TEB, de les sigles en anglès *Terminal End Bud*) que presenten un gran augment en la proliferació, principalment degut a l'acció de l'hormona del creixement, el factor de creixement IGF1 i el receptor d'estrògens (Macias i Hinck, 2013). Durant la vida adulta, els diferents cicles mensuals comporten períodes d'expansió i regressió de la mama (Olsson et al., 1996; Ramakrishnan et al., 2002), però no és fins a la lactància que la glàndula mamària es desenvolupa per complet posant en marxa els processos necessaris per a la producció i secreció de la llet (Hassiotou i Geddes, 2013). Al llarg de totes aquestes etapes hi ha canvis importants tant a nivell morfològic i estructural com d'expressió gènica (Andrechek et al., 2008), motiu pel qual la mama presenta una gran heterogeneïtat durant la vida de l'individu (Figura 2).

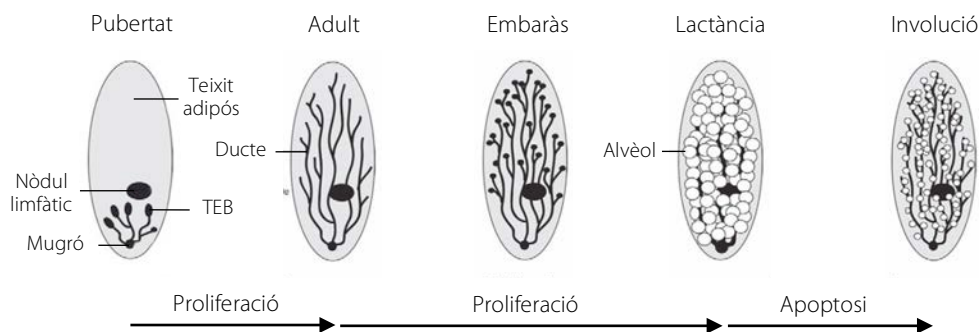


Figura 2. Desenvolupament de la glàndula mamària al llarg de diferents etapes de la vida (Andrechek et al, 2008)

La glàndula mamària està formada per multitud de tipus cel·lulars. Adipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials i del sistema immunitari conviuen amb les cèl·lules epitelials mamàries formant un microambient altament canviant al llarg de les diverses etapes del desenvolupament de la mama (McDaniel et al., 2006; Bussard i Smith, 2011). Un exemple de la gran interacció entre els diferents tipus cel·lulars és la que es produeix per tal de dirigir i efectuar el creixement del TEB durant la pubertat (Figura 3).

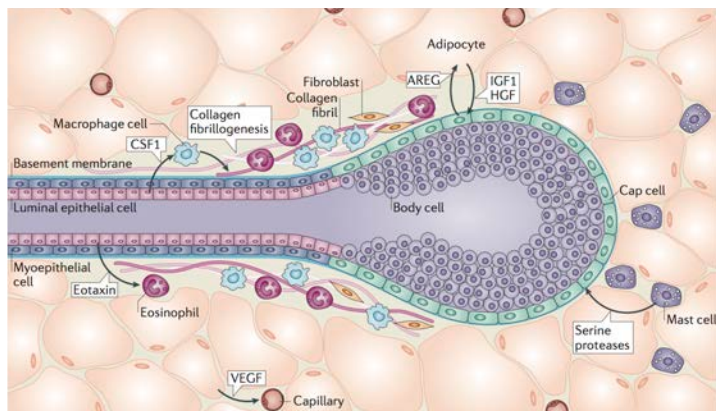


Figura 3. Esquema on es representen els diferents tipus cel·lulars presents al TEB i l'estreta relació que els uneix durant l'etapa proliferativa. (Gjorevski i Nelson, 2011).

Cèl·lules epitelials mamàries

La unitat funcional de la glàndula mamària és l'*acinus*: l'estructura encarregada de la producció de la llet (Bissell i Bilder, 2003). Els diferents *acini* es troben altament irrigats per capil·lars sanguinis i envoltats de fibroblasts que conformen el teixit conjuntiu adjacent (Figura 4A). A l'interior de l'*acinus* s'hi poden distingir dos tipus de cèl·lules epitelials mamàries: les mioepitelials, situades a la perifèria del túbul i de l'alvèol són les encarregades de la secreció de la làmina basal i responsables de la contracció del túbul per facilitar el transport de la llet fins al mugró; i les luminals, que poden formar part del ducte o de l'alvèol (Figura 4). Només les cèl·lules epitelials mamàries luminals alveolars són les responsables de la producció de llet (Van Keymeulen *et al.*, 2011).

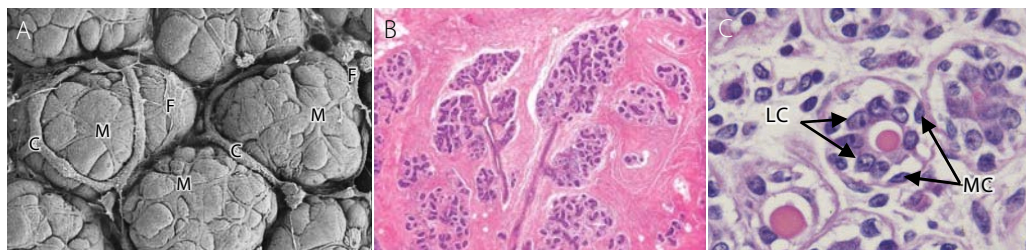


Figura 4. Estructura dels *acini*. A. Micrografia obtinguda amb el microscopi electrònic de rastreig on es mostren múltiples *acini* i es detallen els capil·lars (C), les cèl·lules mioepitelials (M) i els fibroblasts (F) (Standring *et al.*, 2016). B. Tall histològic on s'observen múltiples lobulets envoltats de teixit connectiu (Mills, 2012). C. Secció histològica on s'evidencien diversos *acini*, i on es detallen les cèl·lules mioepitelials (MC) i les luminals (LC) (Russo & Russo, 2014).

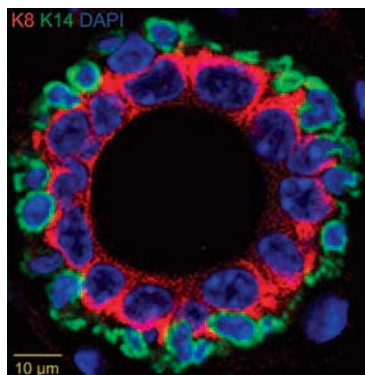


Figura 5. Immunofluorescència de marcadors específics de cèl·lules epitelials mamàries de tipus mioepitelial (K14) i luminal (K8). (Karantza, 2011)

A banda de les diferències funcionals entre els diferents tipus de cèl·lules epitelials mamàries, també existeixen diferències a nivell d'expressió gènica. Les cèl·lules mioepitelials expressen proteïnes del citoesquelet com les citoqueratines 5, 14 i 17 o proteïnes de membrana com la endopeptidasa CD10 però no presenten receptors d'estrògens o progesterona (Petersen *et al.*, 1987; Polyak, 2007). En canvi, les cèl·lules epitelials luminals expressen altres marcadors com les citoqueratines 8, 18 i 19 o les proteïnes transmembrana Claudina 4 i CD227 (Figura 5) i algunes de les cèl·lules luminals del ducte expressen receptors d'estrògens, fet que els permet respondre a estímuls externs (Karantza, 2011).

Tot i que presenten característiques que les distingeixen, els diversos tipus de cèl·lules epitelials mamàries tenen un origen comú (Smith i Chepko, 2001; Stingl *et al.*, 2005; Shackleton *et al.*, 2006) ja que totes elles provenen de les cèl·lules mare mamàries també presents a la glàndula mamària durant la vida adulta (Van Keymeulen *et al.*, 2011). La funció d'aquestes cèl·lules és la producció de noves cèl·lules que ocupin la posició que deixen lliure les cèl·lules que han mort. Aquestes cèl·lules mare mamàries donen lloc a cèl·lules progenitores amb diferents graus de diferenciació per originar cèl·lules mioepitelials o cèl·lules luminals (Rios *et al.*, 2014; Figura 6A). Tot i que es desconeix el mecanisme pel qual les cèl·lules progenitores acaben donant lloc a les cèl·lules mioepitelials i les luminals, el que sí que s'ha descrit és que els diferents tipus de cèl·lules epitelials mamàries ocupen una posició concreta dins els ductes i alvèols (Figura 6B), com és el cas de les cèl·lules mare mamàries que es troben presents exclusivament al ducte (Villadsen *et al.*, 2007).

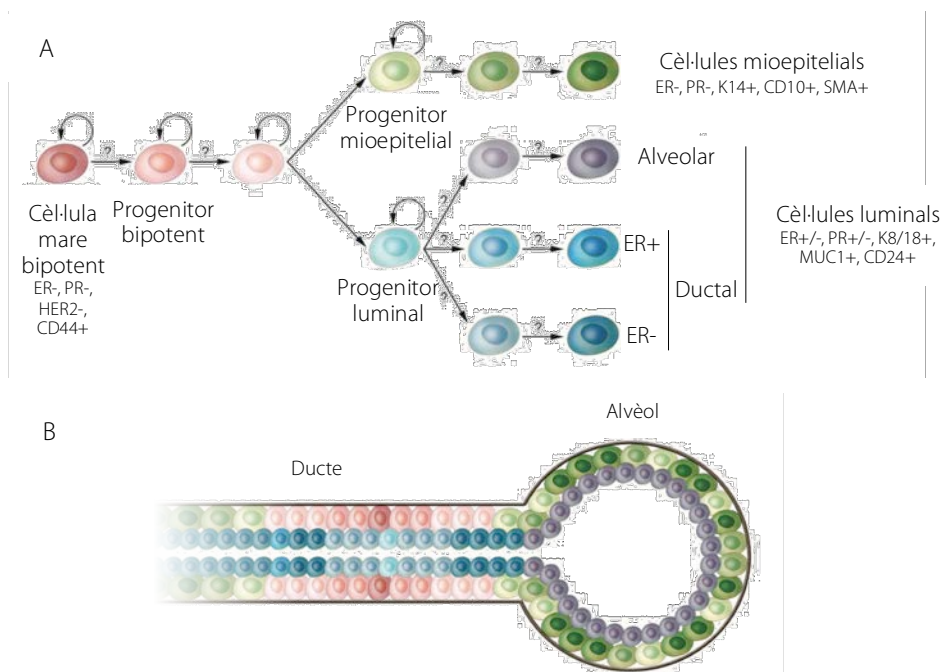


Figura 6. Diferents tipus de cèl·lules epitelials mamàries amb un origen comú. **A.** Esquema on es representa la jerarquia entre els precursors comuns i els tipus de cèl·lules epitelials mamàries resultants. **B.** Esquema de la distribució dels diferents tipus de cèl·lules epitelials mamàries dins el túbul i l'alvèol.

Així doncs, el fet de tractar-se d'un òrgan duplicat no essencial i tenint en compte el seu desenvolupament fraccionat i els cicles de proliferació/regressió que pateix al llarg de la vida reproductiva, les cèl·lules de la glàndula mamària tenen una major propensió a esdevenir tumorals si les comparem a les d'altres òrgans o teixits (Thomas *et al.*, 2016).

Càncer de mama

Segons l'informe realitzat el 2012 per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el càncer de mama és el tipus de càncer diagnosticat amb més freqüència entre les dones d'arreu del món amb una estimació de 1,67 milions de nous casos anuals, representant un 25% dels càncers identificats anualment (Figura 7). És també la primera causa de mort per càncer en dones, essent la mortalitat relacionada amb aquest tipus de càncer del 15%. Tot i ser el càncer amb una major incidència i mortalitat sobre la població femenina, també és el que presenta una millor prevalença 5 anys després del diagnòstic, indicant que els pacients afectats per aquest tipus de càncer acostumen a respondre al tractament i superar la malaltia (Ferlay *et al.*, 2015; Figura 7).

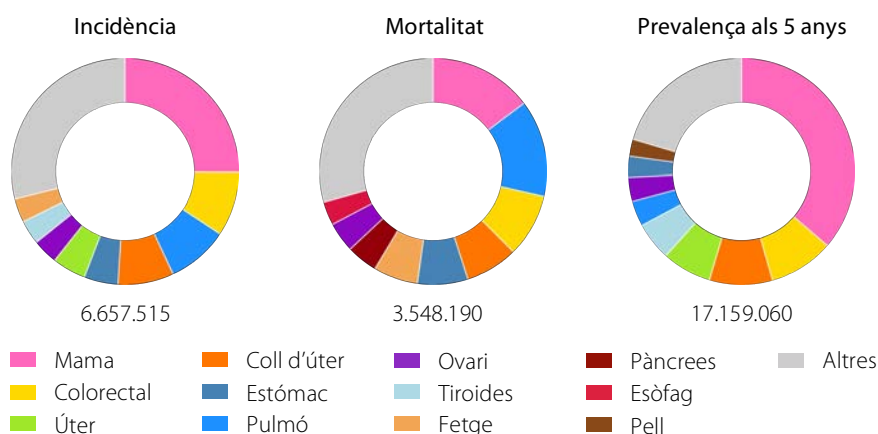


Figura 7. Incidència estimada, mortalitat i prevalença 5 anys després del diagnòstic dels diferents tipus de càncer en la població de dones d'arreu del món; sota de cada paràmetre s'indica el nombre de casos estimats anualment. Font: OMS.

Fonaments del càncer

El cos humà requereix generar 10 bilions de cèl·lules noves diàriament per substituir aquelles que han mort de forma programada (Renehan *et al.*, 2001). És evident que amb un nombre tan elevat de divisions la regulació del creixement i la proliferació cel·lular són essencials per mantenir l'homeòstasi de l'organisme (Tower, 2015).

Quan el control sobre la proliferació cel·lular es veu compromès, les cèl·lules afectades poden créixer de forma excessiva formant el que s'anomena neoplàsia o tumor. Lluny de tractar-se d'una simple agregació de cèl·lules descontrolades, el tumor és un teixit complex que inclou diferents tipus cel·lulars, tant sans com tumorals (Hanahan i Weinberg, 2000; Egeblad *et al.*, 2010; Figura 8).

Quan el tumor es troba localitzat es parla de tumor benigne, però quan les cèl·lules transformades envaeixen altres teixits adjacents o distants es considera un tumor maligne o càncer.

Els diferents tumors reben el seu nom en funció del tipus cel·lular afectat; es parla de carcinoma quan les cèl·lules afectades tenen un origen epitelial, de sarcoma quan tenen origen mesenquimal (teixit conjuntiu), de leucèmies si provenen de cèl·lules originades a la medul·la òssia i de limfomes si són de teixit limfàtic. En el cas del càncer de mama, el més freqüent són els carcinomes ja que el

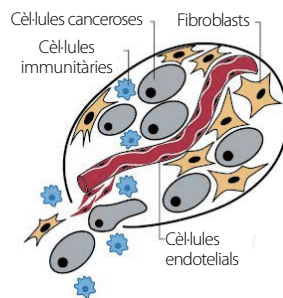


Figura 8. El tumor és un teixit complex que comprèn múltiples tipus cel·lulars (Hanahan i Weinberg, 2000).

procés de desregulació del creixement cel·lular acostuma a afectar les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària. El 1972 el professor Hubert Campbell (1920-2007) es referia al càncer de mama com “una malaltia endèmica que s’ha estat investigant durant 200 anys, i l’únic que es coneix amb certesa referent al seu origen és la seva complexitat” (Campbell, 1972; Horn i Vatten, 2017). Tanmateix, els estudis realitzats al llarg dels següents 40 anys han permès aprofundir en els processos que caracteritzen l’origen d’aquest tipus de transformació tumoral.

Característiques de les cèl·lules tumorals

Perquè s’arribi a originar un tumor són necessaris múltiples esdeveniments consecutius. El 2011, Hanahan i Weinberg van descriure 10 capacitats que permeten el creixement, la supervivència i la disseminació de les cèl·lules transformades: els anomenats “Hallmarks of Cancer” (Figura 9).



L’adquisició dels diferents *Hallmarks of Cancer* es pot donar de diverses maneres. Per exemple, algunes cèl·lules mostren un augment de l’expressió del nombre de receptors dels factors de creixement que afavoreix la proliferació sostinguda. Paral·lelament poden presentar una

Figura 9. Representació dels *Hallmarks of Cancer* descrits per Hanahan i Weinberg el 2011.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

inactivació de proteïnes supressores de tumors com p53 o retinoblastoma (pRb) comportant l'evasió dels mecanismes supressors del creixement i afavorint la resistència a la mort cel·lular o la inestabilitat genòmica (Vélez-Cruz *et al.*, 2016). Un cop la integritat genòmica està compromesa es poden originar multitud de reorganitzacions cromosòmiques que poden afectar un ampli ventall de processos. Les translocacions observades en diversos teixits tumorals acostumen a activar un oncogen com a resultat de la fusió de dos gens que abans es trobaven separats, o inactivar gens supressors de tumors truncant-los o separant-los del seu promotor (Vogelstein *et al.*, 2013). Amb aquests o altres mecanismes s'arriben a alterar processos cel·lulars molt variats com ara la regulació energètica de la cèl·lula, l'expressió de proteïnes de membrana involucrades en el reconeixement del sistema immunitari o la remodelació de les proteïnes del citoesquelet afavorint la migració i la metastasi (Hanahan i Weinberg, 2011).

Sense els mecanismes de control de l'homeòstasi, tant interns com externs, la cèl·lula en procés de transformació pateix una degeneració contínua en la que acumula multitud d'alteracions. Tot i que la major part de les mutacions generades no contribueixen directament a la transformació de la cèl·lula (Vogelstein *et al.*, 2013), algunes d'elles aporten un avantatge significatiu a la cèl·lula que les presenta, afavorint així la seva fixació a la població (Alberts *et al.*, 2015). Aquest tipus de mutacions es produeixen en repetides ocasions en multitud de cèl·lules que es troben en procés de transformació, fet que provoca una gran heterogeneïtat de subpoblacions dins del mateix tumor contribuint a un entorn constantment canviant sotmès a una forta pressió selectiva (Stingl i Caldas, 2007; Stratton *et al.*, 2009; Figura 10).

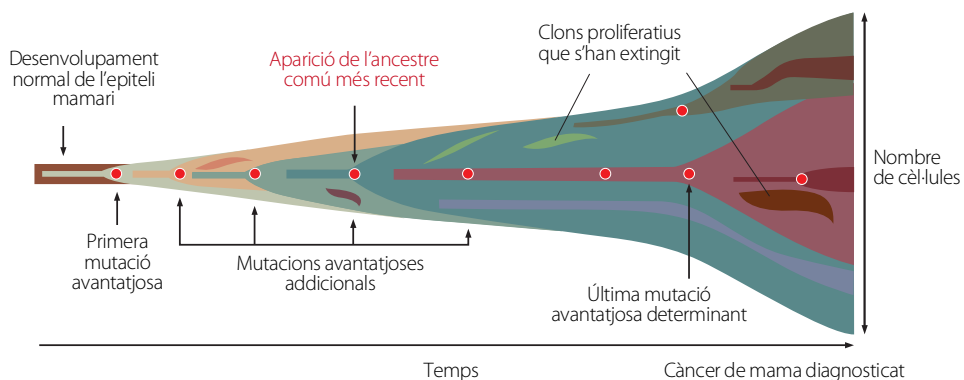


Figura 10. Mutacions successives durant el procés de formació d'un tumor (Alberts *et al.*, 2015).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

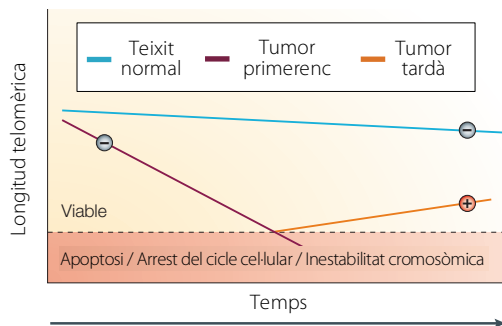


Figura 11. Canvis en la longitud telomèrica al llarg de la progressió del tumor (Blasco, 2005).

La progressió del tumor és l'assoliment de la immortalitat replicativa (Blasco, 2005). Durant el procés de transformació s'ha observat la reactivació de mecanismes que permeten l'elongació dels telòmers com l'expressió de l'enzim telomerasa (hTERT), present en un ~90% dels càncers humans (Hanahan i Weinberg, 2011; Figura 11). Aquesta recuperació de la longitud telomèrica no reverteix les reorganitzacions que s'hagin pogut produir però confereix estabilitat al genoma i evita la crisi telomèrica que comportaria la mort de la cèl·lula.

Durant la progressió del tumor se seleccionen positivament aquelles característiques que afavoreixen el creixement de les cèl·lules, ja sigui directament per part de les pròpies cèl·lules tumorals o indirectament adaptant el micro-ambient en què es troba el tumor. En aquest sentit es veuen potenciades aquelles cèl·lules que generen factors pro-inflamatoris que indueixen una resposta immunitària local (Figura 12). A priori podria semblar que aquesta resposta és contraproductiva per la progressió del tumor però paradoxalment la infiltració de cèl·lules immunitàries, majoritàriament les implicades en la resposta innata, subministren factors de creixement, modificacions de la matriu extracel·lular i factors promotors de l'angiogènesi que afavoreixen el creixement i la dispersió de les cèl·lules tumorals a altres òrgans (Grivennikov *et al.*, 2010).

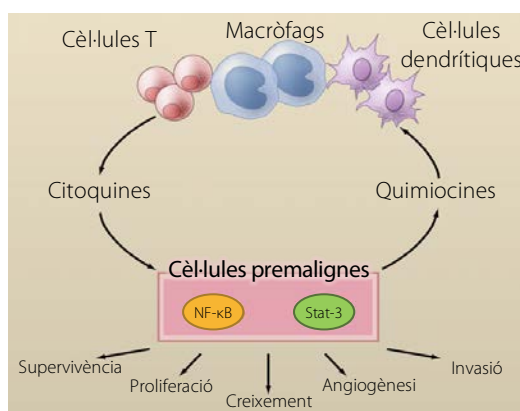


Figura 12. Implicació del sistema immunitari en la formació i progressió del tumor (Grivennikov *et al.*, 2010).

En el cas concret del càncer de mama també es donen totes aquestes alteracions tot i que, com en la resta dels càncers, la successió d'aquests esdeveniments requereix dècades abans no s'arriba a la formació d'un tumor amb plena capacitat metastàtica (Vogelstein *et al.*, 2013).

Classificacions del càncer de mama

Encara que la majoria dels càncers de mama tinguin en comú el seu origen en les cèl·lules epitelials mamàries, es poden distingir diferents subtipus de càncer de mama en funció de diversos paràmetres. La morfologia, els teixits afectats, el subtipus cel·lular o els marcadors moleculars permeten classificar els diferents casos distingint-los de la resta, d'aquesta manera s'obté informació específica de cada cas com ara el pronòstic o el tractament més adequat per tractar-lo (Malhotra *et al.*, 2010).

Històricament s'ha utilitzat la classificació histològica per tal de categoritzar les mostres de teixit tumoral i escollir el tractament que aconsegueix el millor pronòstic. En aquestes anàlisis s'hi detecta majoritàriament si les cèl·lules del tumor presenten receptors d'estrògens i de progesterona així com amplificació del producte oncogènic Her2/neu (Redig i McAllister, 2013; Figura 13).

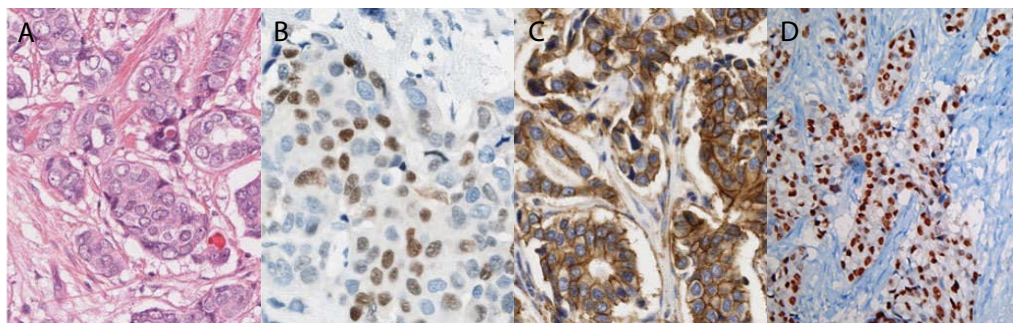


Figura 13. Seccions histològiques de mostres de teixit mamari humà sa (A-C) i tumoral (D). **A.** Tinció amb Hematoxilina/eosina. **B.** Tinció del receptor d'estrògens (ER). **C.** Tinció de HER2 amb contratinció de hematoxilina (Veta *et al.*, 2014). **D.** Tinció del receptor de progesterona (PR) (Li *et al.*, 2015).

Altres característiques que permeten classificar el càncer de mama són el grau del tumor o el paràmetre TNM. En el grau es valora les diferències morfològiques entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules sanes; a major grau, major diferència i pitjor pronòstic. El paràmetre TNM fa referència a 3 factors: la mida del tumor (T; 0-4), l'afectació dels ganglis limfàtics (N; 0-4) i la presència o no de metàstasi (M; 0-1). En tots els casos a major puntuació pitjor és el pronòstic (Taherian-Fard *et al.*, 2015).

Recentment, l'avenç en la biologia molecular i el creixent coneixement sobre el càncer de mama han permès identificar marcadors específics dels diferents subtipus de càncer de mama permetent la seva classificació mitjançant criteris moleculars (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001; Prat i Perou, 2009). Aquest nou mètode de diagnòstic ha demostrat ser coherent amb la classificació histopatològica existent, ja que s'ha descrit una clara concordança entre la classificació histopatològica clàssica i la molecular (Sotiriou i Pusztai, 2009), i és fins i tot més sensible a l'hora de detectar possibles dianes terapèutiques ja que l'anàlisi no es limita a la morfologia o l'expressió de certs receptors de membrana (Prat *et al.*, 2015).

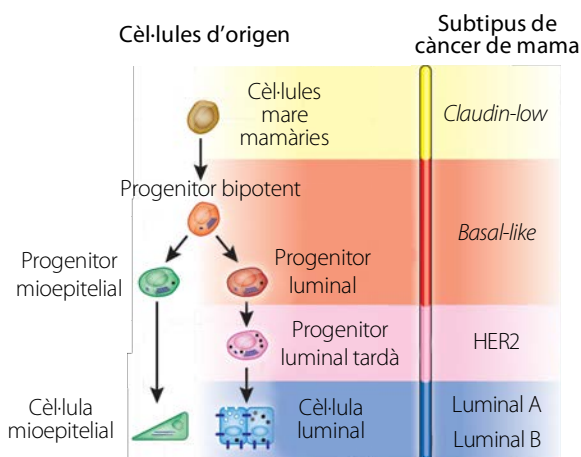


Figura 14. Model descrit per (Prat i Perou, 2009) de la jerarquia de les cèl·lules epitelials mamàries humanes i la seva relació amb el subtipus de càncer.

Segons la classificació molecular del càncer de mama, les alteracions observades als diferents subtipus indiquen que cadascuna de les variants podria originar-se a partir de tipus cel·lulars diferents amb propietats biològiques específiques (Sotiriou i Pusztai, 2009; Figura 14).

L'anàlisi exhaustiva de les característiques que presenten els tumors permet realitzar estudis epidemiològics que ajuden a

entendre la naturalesa de la malaltia i a millorar el seu tractament i, per tant, pronòstic. Tot i així, per tal de verificar les hipòtesis que es plantegen per explicar els fenòmens observats, sovint és necessari realitzar experiments per identificar factors concrets. Una eina essencial per tal d'estudiar el càncer i testar nous tractaments és l'ús de models cel·lulars d'experimentació. Aquests permeten estudiar el comportament de les cèl·lules cultivades fora de l'organisme per treure'n conclusions i extrapolar la resposta del pacient davant d'un determinat tractament. Si bé aquest tipus d'estudi s'allunya de la realitat fisiològica, per contrapartida aporta a l'experimentador un guany en rapidesa i reproductibilitat dels experiments.

Models de transformació

El cultiu cel·lular consisteix en l'extracció de cèl·lules d'un organisme per fer-les créixer en un ambient artificial. L'ús de cultius de cèl·lules in vitro per tal d'estudiar els processos biològics es va realitzar per primera vegada el 1907 de la mà del doctor Harrison ([Harrison et al., 1907](#)). Des de llavors s'ha millorat el procés de derivació dels cultius cel·lulars així com la superfície i els medis de cultiu utilitzats, permetent la manipulació in vitro de multitud de tipus cel·lulars ([Barronns et al., 2003](#); [Castell i Gómez-Lechón, 2009](#); [Grupen, 2014](#)). Pel que fa al cultiu de cèl·lules epitelials mamàries humanes, el 1980 es va establir per primera vegada un cultiu mixt de cèl·lules epitelials mamàries amb activitat proliferativa ([Stampfer et al., 1980](#)).

Des del primer moment es va aconseguir seleccionar amb certa facilitat la població de fibroblasts i cèl·lules amb característiques mioepitelials per obtenir-ne cultius purs. En canvi, el cultiu enriquit de cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals ha presentat més dificultats ([Dairkee et al., 1986](#); [O'Hare et al., 1991](#); [Ethier et al., 1993](#); [Matoušková et al., 2000](#)). Tanmateix, el 2007 Weinberg i col·laboradors van descriure un mètode de cultiu que potenciava la preservació de cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals i permetia el seu cultiu perllongat sense alteracions aparents ([Ince et al., 2007](#)). Aquest mètode consisteix a derivar cultius primaris a partir de teixit mamari sa sobre una superfície modificada anomenada Primaria® i amb un medi de cultiu definit anomenat WIT. Les cèl·lules obtingudes amb aquesta metodologia es van anomenar BPEC (de les sigles en anglès de *Breast Primary Epithelial Cells*).

A mesura que milloraven les tècniques de cultiu cel·lular i es consolidaven els diferents cultius de diversos tipus cel·lulars també emergien models experimentals que utilitzaven aquests cultius per estudiar el procés de transformació i els esdeveniments que s'hi donen ([Hahn, 2002](#)). Per una banda, alguns estudis se centraven en comparar el comportament in vitro de cèl·lules tumorals respecte les cèl·lules sanes per identificar-ne les diferències. Per altra banda, diferents estudis intentaven induir un procés de transformació artificial exposant les cèl·lules a diferents compostos per veure quin efecte tenien sobre elles i elaborar un model de transformació experimental que permetés estudiar el càncer in vitro. En alguns casos es van utilitzar agents químics o físics com el benzo(a)pirè o la radiació ionitzant per induir la transformació en cultius de cèl·lules sanes ([Stampfer et al., 1985](#); [Kang et al., 1998](#)), en altres es van seleccionar clons immortals que aparegueren espontàniament en cultiu ([Rhim et al., 1985](#)). Però no va ser fins el

1999 que es va aconseguir transformar experimentalment cèl·lules embrionàries de ronyó i fibroblasts humans sans exclusivament a partir d'alteracions gèniques dirigides (Hahn *et al.*, 1999). Utilitzant la mateixa metodologia, el 2001 el grup de Robert Weinberg va transformar cèl·lules epitelials mamàries sanes de tipus mioepitelial (Elenbaas *et al.*, 2001). Tot i així, els tumors formats per aquestes cèl·lules transformades experimentalment presentaven característiques típiques de carcinomes escamosos, tumors molt poc freqüents en el cas particular del càncer de mama humà.

Pocs anys després, utilitzant el sistema de transformació que havien descrit, el mateix grup va transformar les cèl·lules epitelials mamàries humanes amb característiques luminals (BPEC). En aquest cas les cèl·lules transformades van formar tumors en ratolins immunodeprimits amb una histopatologia similar a la dels adenocarcinomes, causants de la major part de les neoplàsies de mama en humans, indicant que la transformació experimental d'aquest tipus cel·lular podria ser un bon model per estudiar el càncer de mama (Ince *et al.*, 2007).

Les alteracions gèniques dirigides que s'utilitzen en aquest models de transformació experimental són les següents (Figura 15):

1. Els gens que codifiquen els antigens *Large T* i *small t* (**Ttag**) del virus de simi 40 (SV40). Aquest virus utilitza Ttag per mantenir la proliferació de la cèl·lula hoste i assegurar així la seva propagació. Per una banda l'antigen *Large T* s'uneix a p53 impeding que aquesta proteïna interaccioni amb el DNA i activi la transcripció de diversos factors reguladors i, per tant, produint un efecte inhibitori de la via de p53 (Lilyestrom *et al.*, 2006); també s'uneix al supressor de tumors retinoblastoma (pRb) impeding la correcta regulació dels factors de transcripció E2F (Ahuja *et al.*, 2005). Per altra banda l'antigen *small t* també està involucrat en la inhibició de p53 tot i que el seu paper més estudiat és l'alteració de l'activitat de la fosfatasa PP2A, que actua com a supressor de tumors (Cho *et al.*, 2007). En conjunt la introducció de Ttag permet desregular els mecanismes de control cel·lular i per tant es toleren situacions com ara reorganitzacions cromosòmiques o dany al DNA que en condicions normals conduirien a la mort de la cèl·lula.
2. El gen que codifica la subunitat catalítica de l'enzim telomerasa (**hTERT**). La subunitat hTERT, juntament amb el component RNA de la telomerasa (hTERC), permet l'elongació telomèrica mitjançant l'addició de nucleòtids als extrems dels cromosomes. Durant el procés de

transformació és habitual que es produeixi un escurçament telomèric degut a l'augment de divisions aquestes de les cèl·lules. La restauració de la longitud telomèrica és un esdeveniment clau per evitar la crisi deguda a l'erosió telomèrica excessiva i permetre la immortalització del cultiu cel·lular.

3. L'oncogen **HRAS**. A diferència dels altres dos elements genètics, *HRAS* és un gen que s'expressa de forma endògena a les cèl·lules somàtiques humanes. En aquest cas l'alteració consisteix en unir el gen a un promotor d'expressió constitutiva per augmentar el seu nivell d'expressió. Normalment l'increment massiu de senyalització promotora de la divisió comportaria la senescència induïda per oncogen (OIS de les sigles en anglès *Oncogene Induced Senescence*; [Serrano et al., 1997](#); [Collado et al., 2007](#)), per aquest motiu aquesta alteració es produeix conjuntament amb les altres dues ja que per una banda la presència de Ttag i la conseqüent inhibició de p53 i RB impedeixen que aquesta resposta es doni, i per altra banda hTERT evita que l'augment en la proliferació agreugi l'escurçament telomèric.

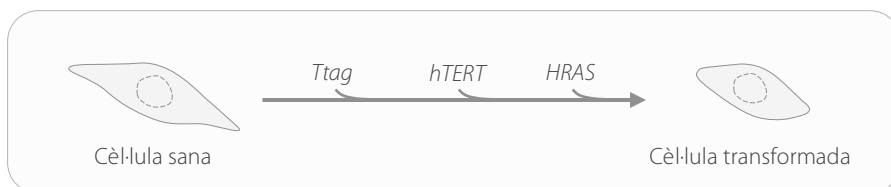


Figura 15. Esquema del model de transformació experimental de cèl·lules epitelials mamàries mitjançant les alteracions genètiques *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*.

Per tal d'introduir aquestes alteracions de forma permanent a les cèl·lules es van utilitzar retrovirus que, mitjançant la pròpia maquinaria d'infecció, van permetre la inserció dels gens d'interès al genoma de les cèl·lules hostes ([Elenbaas et al., 2001](#); [Ince et al., 2007](#)).

Existeixen altres models de transformació experimental on s'utilitzen cèl·lules epitelials mamàries. Un exemple és el model descrit per Calaf i Hei el 2000 en el què exposen cèl·lules epitelials mamàries immortalitzades de manera espontània in vivo a diferents dosis de rajos α en presència o absència d'estrògens en el medi de cultiu ([Calaf i Hei, 2000](#)). D'aquesta manera van demostrar que la radiació i els nivells d'estrògens són inductors del càncer de mama i actuen sinèrgicament.

En un altre estudi es va utilitzar un model similar per avaluar l'efecte de l'exposició a radiació ionitzant juntament amb l'exposició a condensat de fum de cigarret sobre la transformació. Una exposició a 0,1 Gy de rajos γ i 10 $\mu\text{g/ml}$ de condensat de fum de cigarret van ser suficients com per generar canvis genètics i fenotípics similars a aquells presents en les cèl·lules canceroses com l'augment de la mobilitat o la disminució de proteïnes com p53 o p21 (Botlagunta *et al.*, 2010).

En tots els casos, quan s'avalua el resultat d'un procés de transformació experimental es comparen les característiques que presenten les cèl·lules a les que se'ls hi ha induït la transformació amb les cèl·lules que no han estat tractades. D'aquesta manera s'identifica si els canvis introduïts aporten les característiques que presenten cèl·lules derivades de tumors generats de forma natural. Per fer-ho, s'utilitzen diferents tests, alguns dels quals es descriuen a continuació.

Tests per estudiar la tumorigènesi

Per saber si els procediments experimentals als que han estat sotmeses les cèl·lules comporten canvis en el fenotip o genotip compatibles amb la seva transformació s'utilitzen múltiples tests tant *in vivo* com *in vitro*. Aquests estudis permeten estudiar aquelles característiques que defineixen les cèl·lules derivades de tumors, com ara l'augment en la proliferació o la seva capacitat invasiva. A continuació se'n detallen alguns del més utilitzats.

Generació de tumors en ratolins immunodeprimits

Un dels tests més concloents per estudiar la tumorigènesi és la inoculació de les cèl·lules d'estudi en ratolins immunodeprimits per testar la seva capacitat de formar tumors. En aquest tipus de model es valora el comportament de les cèl·lules en un ambient molt més complex i fisiològicament més similar al present a l'humà, en comparació als tests *in vitro* (Ruggeri *et al.*, 2014).

En funció del lloc d'inoculació de les cèl·lules, es poden distingir els models de transformació ortotòpics, on les cèl·lules s'inoculen a l'espai que ocupa el tipus cel·lular d'origen; o ectòpics, on les cèl·lules s'inoculen en un altre teixit diferent al d'origen, sovint mitjançant injecció subcutània (Figura 16A). Tot i que el context en que es troben les cèl·lules inoculades en ratolins immunodeprimits presenta certes diferències respecte el de les cèl·lules en els teixits humans, el comportament en el model animal dóna una informació molt valuosa per estudiar els processos que s'hi donen (Rashid i Takabe, 2015). A banda d'utilitzar-se com un test per validar la formació de

cèl·lules amb característiques tumorals també s'utilitza aquest model per estudiar la resposta a determinats fàrmacs antitumorals. (Figura 16B).

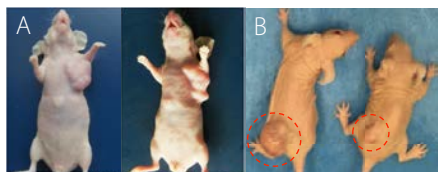


Figura 16. Models animals per estudiar el procés de transformació. **A.** Formació de tumors ectòpics en ratolins immunodeprimits (Wang *et al.*, 2014a). **B.** Estudi de tractaments antitumorals en models animals on es pot observar com el tractament (dreta) redueix dràsticament la mida del tumor (esquerra) (Oram *et al.*, 2006).

Creixement en cultius 2D

Un dels canvis més evidents observat en les cèl·lules presents en tumors avançats és l'augment en la taxa proliferativa degut a la desregulació del cicle cel·lular. En els cultius cel·lulars bidimensionals (2D), aquest augment de la proliferació es tradueix en una disminució en el temps necessari per completar el cicle cel·lular i en un augment de cèl·lules presents en el cultiu si es compara amb un cultiu de cèl·lules sanes. Aquest increment es pot mesurar de forma directa mitjançant el recompte de cèl·lules mitòtiques, l'anàlisi del cicle cel·lular o el càlcul de l'índex de proliferació mitjançant el recompte de cèl·lules al llarg del temps (Figura 17). Existeixen altres mètodes de mesura indirecta de la proliferació cel·lular d'un cultiu com l'assaig MTT o l'Alamar Blue on es quantifica l'activitat metabòlica de les cèl·lules per inferir el nombre de cèl·lules presents en el cultiu (Hamid *et al.*, 2004).

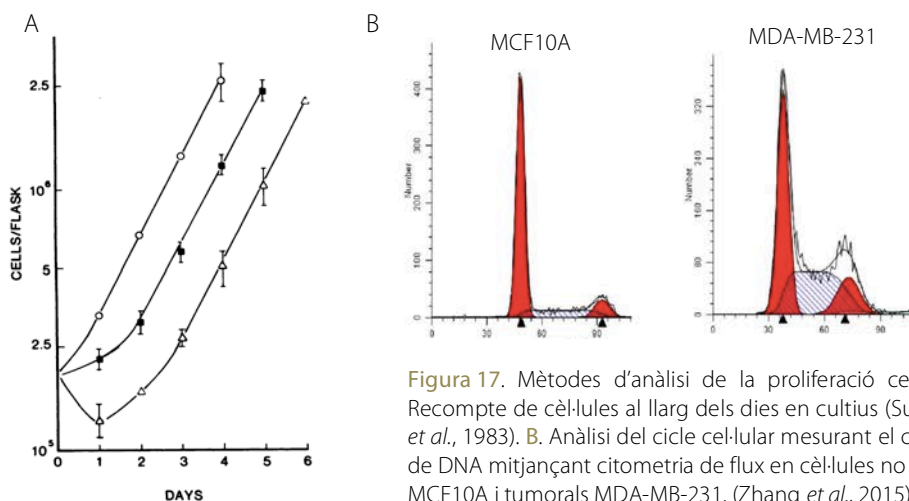


Figura 17. Mètodes d'anàlisi de la proliferació cel·lular. **A.** Recompte de cèl·lules al llarg dels dies en cultius (Sutherland *et al.*, 1983). **B.** Anàlisi del cicle cel·lular mesurant el contingut de DNA mitjançant citometria de flux en cèl·lules no tumorals MCF10A i tumorals MDA-MB-231. (Zhang *et al.*, 2015)

Creixement en cultius 3D amb Matrigel

Tot i els avantatges que aporten els cultius cel·lulars sobre superfície (o cultius 2D), sovint les condicions en les que es troben les cèl·lules in vitro són molt diferents a les que hi havia inicialment al teixit. Els cultius tridimensionals permeten a les cèl·lules créixer en condicions més similars a les fisiològiques i organitzar-se espacialment sense les limitacions que presenten els cultius 2D (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989; Shaw *et al.*, 2012). En aquest sentit, alguns estudis asseguren que l'ús de matrius riques en col·lagen, fibrinogen i laminina, com el Matrigel o altres fonts de matriu extracel·lular, són mètodes molt útils per estudiar tant la formació d'estructures tridimensionals com les vies implicades en la progressió del càncer (Weigelt *et al.*, 2014; Sokol *et al.*, 2016). En el cas del càncer de mama, s'ha demostrat que els canvis que presenten les cèl·lules tumorals també afecten al seu creixement en Matrigel: mentre que les cèl·lules sanes són capaces d'organitzar-se in vitro formant estructures similars als *acini* presents a la glàndula mamària, les cèl·lules transformades no són capaces d'aconseguir-ho i, en canvi, formen masses amorfes i desorganitzades de cèl·lules (Petersen *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2006; Figura 18). D'aquesta manera, l'anàlisi de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu permet valorar les característiques que presenten les cèl·lules estudiades i distingir entre el comportament de les cèl·lules sanes i les cèl·lules transformades.

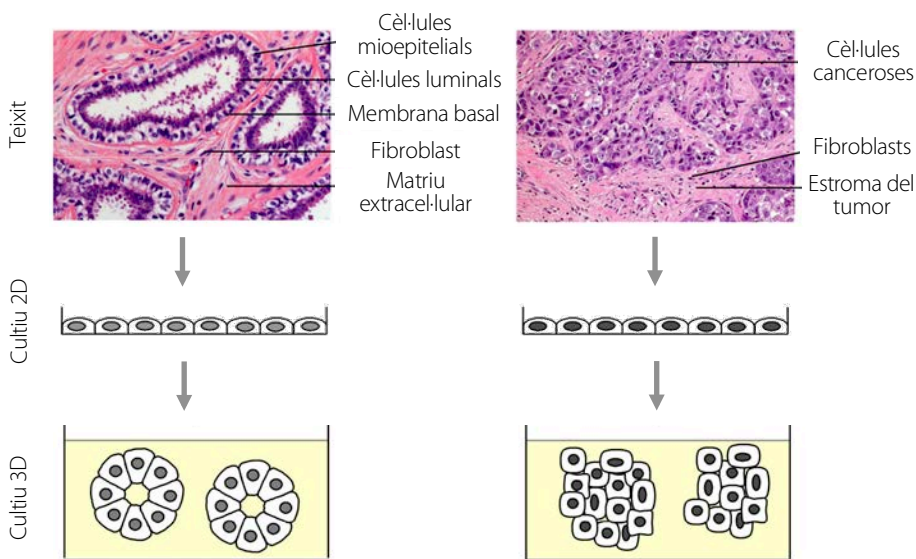


Figura 18. Esquema on es representa el creixement en Matrigel de cèl·lules epitelials mamàries provinents de teixit mamari sa o tumoral (Weigelt i Bissell, 2008).

Test de migració cel·lular i invasivitat (Boyden Chamber)

Una de les principals característiques necessàries pel desenvolupament del càncer és la capacitat per part de les cèl·lules tumorals de modificar el seu entorn per tal de travessar la membrana basal i migrar a teixits adjacents (Te Boekhorst *et al.*, 2016). La metàstasi inclou múltiples processos com la infiltració a través de la matriu extracel·lular, la migració a través dels vasos sanguinis o limfàtics i la formació de colònies en altres teixits (Gupta i Massagué, 2006). En termes de biologia cel·lular experimental, la migració es defineix com el moviment dirigit de la cèl·lula sense obstacles o sense modificació de l'ambient en què es troba; per contra, la invasió implica un migració amb remodelació de les estructures extracel·lulars que limiten el pas de les cèl·lules per tal de superar-les (Kramer *et al.*, 2013).

S'ha descrit un ampli ventall de tècniques per avaluar la migració i la capacitat invasiva de les cèl·lules en cultiu gràcies a les quals s'ha demostrat in vitro, per exemple, que les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de travessar la membrana basal, fet que es veu correlacionat amb el grau de malignitat in vivo (Calaf i Hei, 2000). L'avantatge que presenten aquests tests és la relativa senzillesa que els fa adequats per estudiar l'efecte de múltiples compostos sobre la mobilitat i la invasió (Figura 19).

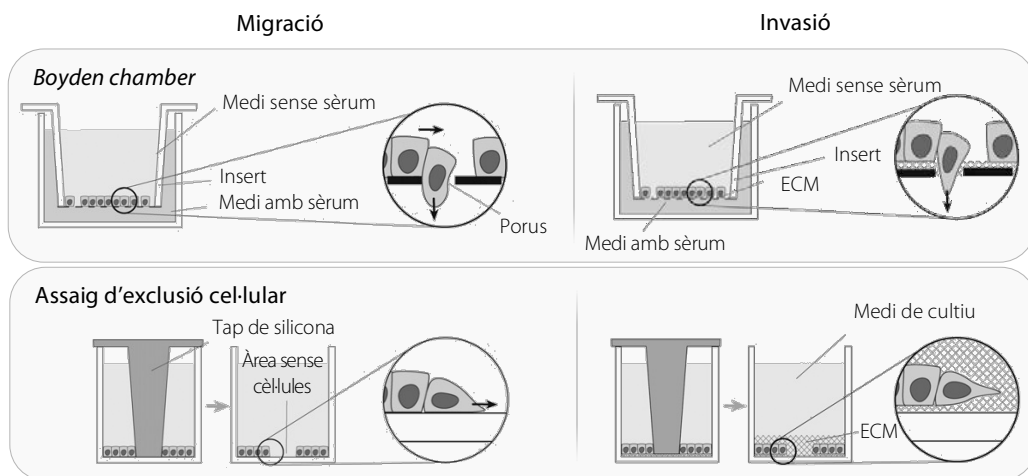


Figura 19. Tests per estudiar la migració cel·lular i la capacitat invasiva de les cèl·lules. La cambra Boyden consisteix de dues cavitats separades per una membrana amb un porus de diàmetre conegut. Les cèl·lules se sembren en una de les cavitats, mentre l'altra conté substàncies atraïents que indueixen la quimiotaxi. Per altra banda, l'assaig d'exclusió cel·lular consisteix en sembrar les cèl·lules evitant que s'adhereixin a certes zones de la superfície de cultiu. Un cop adherides, es retira l'element que bloquejava la zona permetent que les cèl·lules adjacents s'hi desplacin. En funció de la presència o absència de barreres en el cultiu, com la matriu extracel·lular, es pot estudiar la migració o la invasió cel·lular utilitzant els mateixos tests (Kramer *et al.*, 2013).

Perfil d'expressió gènica

Els canvis fenotípics reflecteixen canvis a nivell d'expressió gènica. En aquest sentit les cèl·lules transformades també presenten patrons d'expressió diferents als de les cèl·lules sanes (**Figura 20A**). De fet, els perfils d'expressió gènica no només permeten distingir les cèl·lules sanes de les tumorals sinó que també permeten distingir diferents tipus de tumors derivats d'un mateix teixit. Com s'ha comentat anteriorment, en el cas concret del càncer de mama, s'han descrit mètodes predictius com el PAM50 que permeten identificar els diferents subtipus en funció del patró d'expressió d'un grup específic de gens (**Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Inoue i Fry, 2016; Figura 20B**). En altres àmbits, els patrons d'expressió també s'han utilitzat per veure la resposta de certs tipus cel·lulars davant de la radiació ionitzant per predir la resposta que tindria el pacient a un tractament amb radioteràpia (**Finnon et al., 2012; Smirnov et al., 2012**).

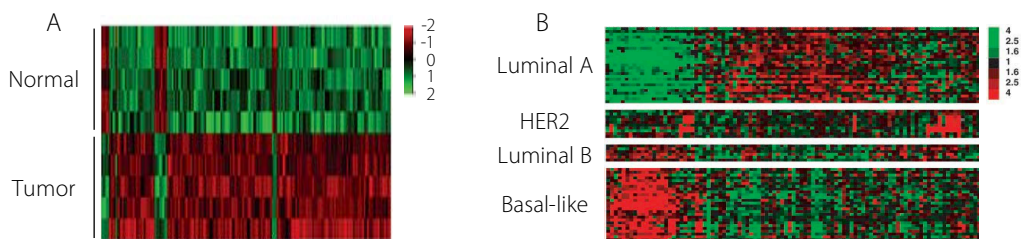


Figura 20. Perfils d'expressió gènica. A. Comparació entre els nivells d'expressió de teixit tumoral i teixit sa (Akkiprik et al., 2015). B. Classificació dels diferents subtipus de càncer de mama en funció del perfil d'expressió gènica (Sørlie et al., 2003).

Creixement independent d'ancoratge

Un dels tests més utilitzats per estudiar la tumorigènesi és l'assaig de creixement independent d'ancoratge (**Bertoncello et al., 1982; Fujimichi i Hamada, 2014**). Consisteix en sembrar les cèl·lules en una barreja de medi de cultiu i agar obligant-les a créixer aïllades i en suspensió (**Borowicz et al., 2014**). Es basa en el fet que les cèl·lules sanes aturen el seu creixement quan es troben en suspensió i si aquesta situació es perllonga, s'activa un mecanisme de mort cel·lular programada anomenat *anoikis* (**Taddei et al., 2012**). En el cas de les cèl·lules transformades, aquesta regulació no es dona i per tant es manté el creixement tot i l'absència de substrat sobre el que adherir-se (**Puck et al., 1956; Munshi et al., 2005**). Passades 3 setmanes en cultiu s'afegeix MTT durant 24 hores per tal que les colònies metabòlicament actives formin cristalls visibles al microscopi (**Figura 21**).

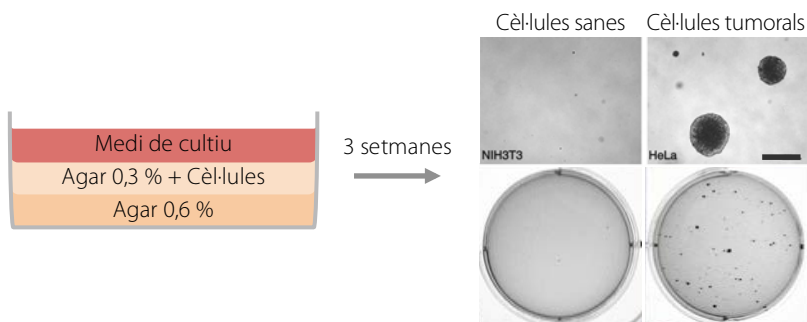
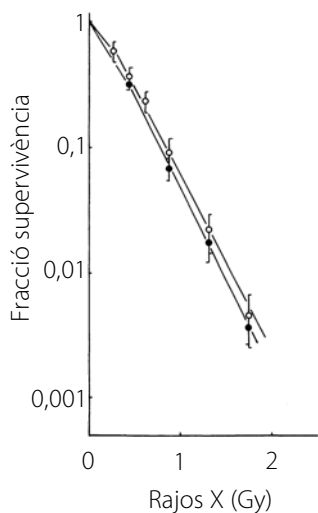


Figura 21. Representació esquemàtica del test de creixement independent d'ancoratge i imatges representatives de les colònies visualitzades al microscopi o a ull nu (Ke *et al.*, 2012). Barra d'escala: 400 µm.



El test de creixement independent d'ancoratge deu el seu origen als estudis dissenyats per valorar l'efecte de la radiació en la supervivència de les cèl·lules tumorals exposades (Puck i Marcus, 1956). Des del seu descobriment s'ha utilitzat en multitud d'estudis per caracteritzar els efectes de la radiació ionitzant convertint-se en una tècnica imprescindible per estudiar processos relacionats amb la radiació (Nakano i Shinohara, 1994; Munshi *et al.*, 2005; Franken *et al.*, 2006; Oonishi *et al.*, 2012; Figura 22).

Figura 22. Quantificació de la supervivència cel·lular mitjançant el recompte de colònies formades per les cèl·lules vives després de ser exposades a diferents dosis de rajos X (Nakano i Shinohara, 1994).

Radiació ionitzant

Diversos estudis epidemiològics han posat de manifest que l'exposició a radiació incrementa el risc de desenvolupar càncer (Aisenberg *et al.*, 1997; de González i Darby, 2004; Ma *et al.*, 2008; Ronckers *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2010). Si bé és cert que per alguns tipus de càncer el nombre de casos diagnosticats ha disminuït al llarg del últims anys, alguns estudis adverteixen del perill que pot tenir subestimar el poder carcinogènic de la radiació donat que el càncer radioinduint acostuma a manifestar-se entre una i dos dècades després de l'exposició (Amis *et al.*, 2007; Gargani i Picano, 2015).

Sovint el terme *radiació* s'associa gairebé de forma immediata amb el dany que pot ocasionar, però és important distingir els diferents tipus de radiació i conèixer les seves propietats ja que la radiació no és sempre perjudicial; de fet, diversos tipus de radiació s'utilitzen a diari i aporten grans millores a la vida quotidiana i a la salut.

Fonament

La radiació en sentit ampli és energia transmesa a través d'un medi o del buit (Campbell i Norman, 1998; Fermi, 1932). Es poden distingir dos tipus de radiació, per una banda la radiació electromagnètica, com la llum o les ones de ràdio, que no té ni massa ni càrrega (Figura 23A) i per l'altra la radiació nuclear que fa referència a partícules energètiques que consten de massa i càrrega (Figura 23B).

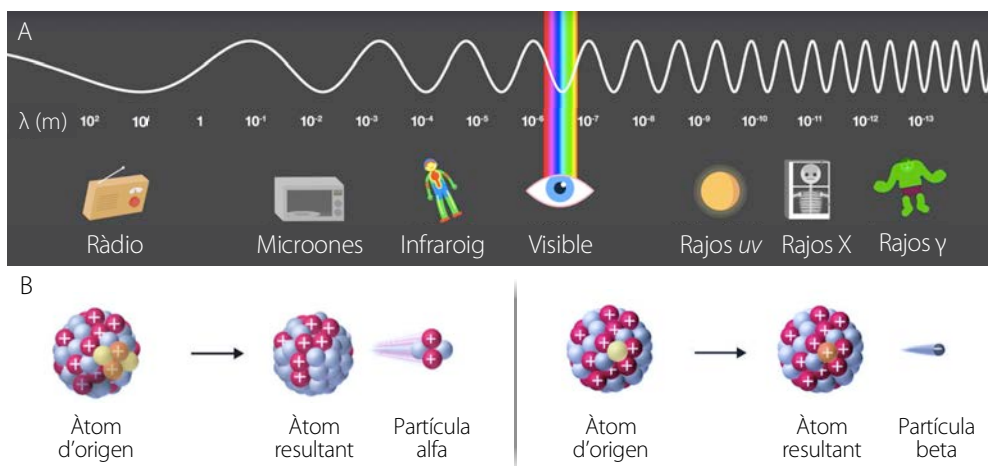


Figura 23. Exemples dels diferents tipus de radiació. **A.** Disposició dels diferents tipus de radiació electromagnètica segons la seva longitud d'ona (Matt, 2016). **B.** Esquema de la formació de partícules alfa i beta, dos tipus de radiació nuclear, a partir dels seus àtoms d'origen (Averill i Eldredge, 2011).

El que defineix la radiació ionitzant és la seva capacitat d'alliberar alguns electrons de l'àtom sobre el que incideix, modificant així la seva estructura. Per aquest motiu únicament la radiació amb prou energia com per alliberar els electrons dels àtoms contra els que impacta es considera ionitzant. Els elements ionitzats són molècules altament reactives que interactuen i modifiquen les estructures del seu voltant causant el dany radioinduït tant de forma directa com indirecta. Mentre que tots els tipus de radiació nuclear són ionitzants, dins de la radiació electromagnètica tan sols els rajos γ , els rajos X i la llum ultraviolada d'alta energia són capaços de ionitzar (Dance *et al.*, 2014).

En gran part la ionització que rep una mostra irradiada depèn de la energia que es diposita sobre el cos exposat. La quantitat d'energia dipositada per unitat de longitud caracteritza els diferents tipus de radiació ionitzant i es quantifica amb el paràmetre "transferència lineal d'energia" (LET de les sigles en anglès de *Linear Energy Transfer*). Quan major sigui aquesta LET més gran serà la ionització i per tant més elevat serà el dany que es produeixi (Hoglund *et al.*, 2000; Niemantsverdriet *et al.*, 2012).

Diagnòstic i tractament

Degut a les seves propietats físiques, la radiació permet una sèrie d'aplicacions molt útils en l'àmbit mèdic (Seibert, 2004). La seva interacció diferencial amb els teixits orgànics permet l'obtenció d'informació de les estructures i cavitats internes de l'organisme minimitzant les intervencions invasives. Per aquest motiu la radiació ha tingut un gran impacte en la medicina, consolidant-se com a element imprescindible en un gran ventall de procediments diagnòstics (Mettler *et al.*, 2008; Figura 24).

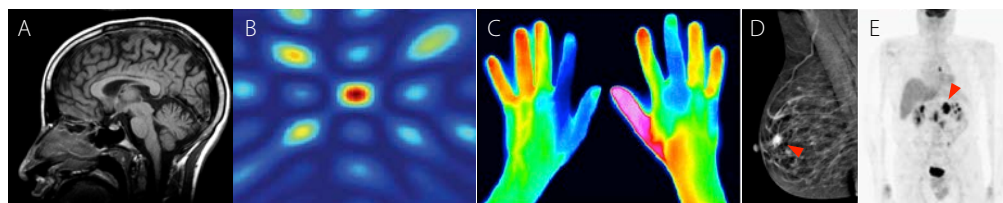


Figura 24. Aplicacions de la radiació en el diagnòstic mèdic. **A.** La resonància magnètica nuclear utilitza ones de ràdio d'alta freqüència. Exemple d'atròfia cerebral diagnosticada gràcies a la resonància magnètica (Carvalho *et al.*, 2014). **B.** Detecció de la difracció de microones per detectar el càncer de mama (Wang *et al.*, 2014). **C.** Termografia mitjançant captació de radiació infraroja. Exemple de síndrome de Raynaud induït per vibració en el sistema mà-braç (Ring i Ammer, 2012). **D.** Mamografia amb rajos X on s'observa un carcinoma lobular invasiu (fletxa vermella) (Lobbès *et al.*, 2015). **E.** La tomografia d'emissió de positrons (PET) detecta els rajos γ emesos per la fludeoxiglucosa (18F) retinguda per les cèl·lules metabòlicament més actives. Exemple de PET de cos complet on s'observen cèl·lules tumorals presents als nòduls limfàtics mesentèrics (fletxa vermella) (Ehrenpreis *et al.*, 2016).

L'ús de la radiació en l'àmbit mèdic no es limita al diagnòstic de patologies, el tractament d'aquestes és una altra de les seves principals utilitats. En el cas de la radioteràpia s'utilitza el dany generat per la radiació per afectar de forma dirigida les cèl·lules tumorals intentant minimitzar l'efecte sobre les cèl·lules sanes (Figura 25).

El tractament de patologies utilitzant la radiació no es limita a l'ús dels rajos X. Altres tipus de radiació com la infraroja, la llum emesa per un làser o la radiació ultraviolada s'utilitzen per tractar casos tant variats com combatre el càncer (El-Sayed *et al.*, 2006), reparar el dany a la retina

(Stefánsson, 2001), eliminar marques de naixement (Garden *et al.*, 2017), tractar l'acne (Elman *et al.*, 2003) o relaxar tensions musculars (Vatanever i Hamblin, 2012).

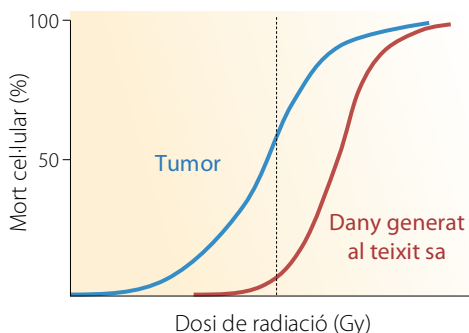


Figura 25. Percentatge de mort cel·lular en funció de la dosi rebuda. A mesura que augmenta la dosi incrementa la probabilitat de cura del tumor però degut a l'exposició inevitable de les cèl·lules sanes, també augmenta el percentatge de mort de les cèl·lules no tumorals. La línia discontinua indica la dosi ideal per dur a terme el tractament amb radioteràpia (Barnett *et al.*, 2009).

Controvèrsia

L'ús d'elements o dispositius que emeten radiació ha anat sempre acompanyat de certa controvèrsia en gran part deguda al desconeixement dels efectes que poden tenir els diferents tipus de radiació sobre l'organisme. Un clar exemple de la discrepància entre diferents estudis científics són les conclusions referents a l'efecte de la radiació emesa pels telèfons mòbils. Mentre que alguns afirmen que els estudis actuals no demostren cap increment en el risc de patir càncer degut al seu ús (Ahlbom *et al.*, 2009), altres asseguren que l'exposició a radiació emesa pels dispositius mòbils provoca el desenvolupament de càncer (Yakymenko *et al.*, 2011). Tot i que la major part dels estudis apunten a que l'ús d'aquestes tecnologies és innocu, se segueix recomanant l'estudi continuat dels possibles efectes derivats de l'ús d'aquestes tecnologies (Cardis, 2010; Cardis i Sadetzki, 2011).

En el cas de la radiació ionitzant s'ha demostrat àmpliament la seva naturalesa nociva a altes dosis però encara no hi ha un clar consens pel què fa a l'exposició a dosis menors. Per tal de predir l'efecte de les dosis moderades i baixes, actualment s'accepta el model lineal sense lliandar (LNT de les sigles en anglès de *Linear Non-Threshold*). Aquest model extrapola els efectes que podrien tenir les dosis baixes de radiació a partir dels resultats observats a dosis altes i moderades, suposant que no hi ha cap dosi innòcua (Figura 26).

La inferència del dany que pot generar una exposició a baixes dosis es fonamenta en estudis epidemiològics realitzats a població exposada a radiació de forma puntual o prolongada (Figura 27A). La necessitat d'extrapolar l'efecte de les baixes dosis a partir de les tendències observades a dosis més elevades és deu a que el nombre de casos necessaris per observar diferències estadísticament significatives degudes a la radiació augmenta de forma exponencial a mesura que es redueix la dosi rebuda (Figura 27B). En altres paraules, quan es produeix l'exposició d'una població a dosis baixes de radiació, és molt difícil distingir entre els casos de càncer esporàdics i els induïts per la radiació.

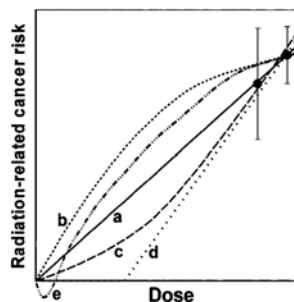


Figura 26. Diferents models per estimar el efectes de les baixes dosis de radiació (Brenner *et al.*, 2003).

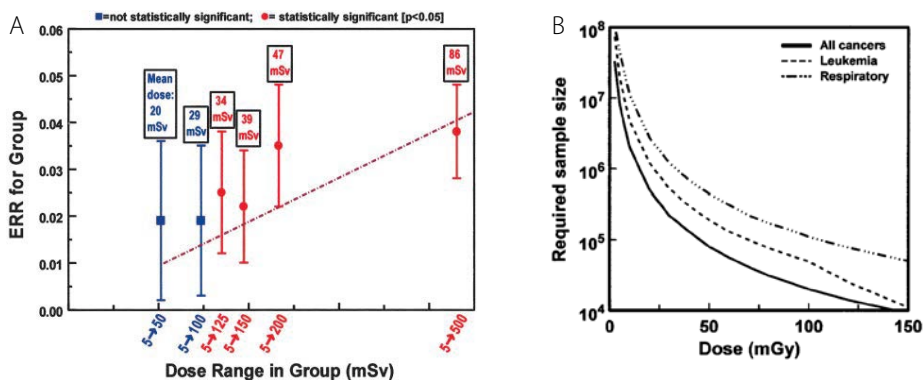


Figura 27. Límit dels estudis epidemiològics per valorar l'efecte de les baixes dosis de radiació (Brenner *et al.*, 2003). A. Risc estimat de mortalitat deguda a càncer sòlid entre els supervivents de la bomba atòmica exposats a dosis de radiació inferiors a 500 mSv. B. Estimació del nombre de casos requerits per estudiar l'efecte tumorigènic de diferents dosis de radiació. Com més baixa és la dosi rebuda, menor és l'efecte que s'espera i per tant cal augmentar el nombre de casos necessaris per identificar-lo.

Tal és la diversitat en la interpretació dels efectes de l'exposició a radiació ionitzant que fins i tot hi ha estudis que descriuen un efecte beneficiós per part de les baixes dosis davant el risc de patir càncer (model "e" representat a la Figura 26). Segons aquests estudis les morts degudes a càncer d'aparició precoç són causades per una exposició insuficient a radiació (Luckey, 2006).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

En conjunt, donada la disparitat en els resultats existents i la falta d'informació referent a l'efecte a baixes dosis, l'ús de la radiació en qualsevol de les seves aplicacions comporta inevitablement una controvèrsia implícita.

És important destacar que la gran majoria dels estudis que se centren en el potencial tumorigènic de l'exposició a radiació ionitzant utilitzen línies cel·lulars considerades normals per analitzar la seva resposta un cop irradiades. Ara bé, factors com l'edat o el *background* genètic afavoreixen la presència de cèl·lules en procés de transformació que podrien comportar una diferent resposta al dany radioinduït dels individus. Per aquest motiu cal investigar la resposta de cèl·lules sanes i cèl·lules en procés de transformació a l'exposició a radiació ionitzant.

Hipòtesi i objectius

Hipòtesi de l'estudi

L'exposició a dosis moderades de radiació pot induir canvis en el genoma de les cèl·lules en procés de transformació que poden contribuir a la completa transformació d'aquestes.

Objectius

Analitzar la susceptibilitat de cèl·lules epitelials mamàries sanes i parcialment transformades a adquirir característiques típiques de cèl·lules transformades a causa de l'exposició a radiació ionitzant. Per tal d'assolir aquest objectiu principal es van plantejar els següents objectius específics:

1. Establir i caracteritzar el model experimental en BPECs derivades de teixit mamari sa.
2. Avaluar l'efecte de la radiació en la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge per part de les BPECs sanes i parcialment transformades.
3. Determinar l'efecte de la radiació en la formació d'estructures organitzades en cultius tridimensionals per part de les BPECs sanes i les parcialment transformades.
4. Avaluar l'efecte de la radiació en el perfil d'expressió gènica de les BPECs sanes i parcialment transformades.

Material i mètodes

Cultiu primari de cèl·lules epitelials mamàries

Tots els experiments recollits en aquesta tesi s'han realitzat en cultius cel·lulars provinents de les mostres de teixit mamari sa de dues pacients, de 20 i 25 anys d'edat, que es van obtenir a partir de mamoplàsties realitzades a la Clínica Pilar Sant Jordi de Barcelona el novembre de 2013. Les dues donants van firmar el seu consentiment informat autoritzant la utilització d'aquest material biològic per propòsits científics.

Procés de derivació

El transport del material biològic des de la clínica fins a les instal·lacions de la unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona es va realitzar en un tub amb medi de transport (composició detallada a l'Annex) mantingut en gel. Per tal de derivar el cultiu primari a partir del teixit mamari sa, es va manipular la mostra en esterilitat dins una cabina de seguretat biològica de classe II seguint el següent procediment:

- Dipositar la mostra sobre un vidre de rellotge col·locat dins d'una placa de petri.
- Netejar de greix la mostra tant com sigui possible amb l'ajuda de pinces i tisores de punta recta.
- Disgregar mecànicament la mostra utilitzant tisores de punta corba fins aconseguir fragments d'aproximadament 1 mm².
- Abocar medi de digestió (composició detallada a l'Annex) sobre el vidre de rellotge. Utilitzar una pipeta Pasteur de plàstic amb la punta retallada per resuspendre els fragments i abocar-los a un tub amb medi de digestió.
- Posar el tub a un agitador rotatori vertical durant 6-8 h perquè es realitzi la digestió enzimàtica. Passades les 6 primeres hores controlar el progrés de la digestió. Es considera que la digestió és correcta quan els fragments són petits i homogenis. La suspensió ha de presentar un color rosat i pràcticament no s'han d'observar fragments de teixit.
- Centrifugar a 200 g durant 5 minuts. Com a resultat s'obtenen les següents 4 fases:
 - Greix (groc): capa fina situada a la part superior.
 - Medi de digestió (transparent): no hauria de contenir ni teixit ni cèl·lules.
 - Suspensió amb fragments digerits (tèrbol).
 - Fragments de teixit sense digerir (dens).
- Descartar la fase que conté el greix i transferir la fase amb medi de digestió a un tub nou per revisar si hi ha restes de teixit. En cas que n'hi hagi caldrà tornar a centrifugar.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Resuspendre el pellet en 2ml de medi de cultiu WIT-P (veure apartat Medis de cultiu) i repartir 8–10 gotes en un flascó T75 deixant espai entre cada gota per aprofitar tota la superfície del flascó. Si hi ha un excés de mostra es pot congelar el producte de la digestió per sembrar organoids més endavant (veure apartat Cultiu de les BPEC).
- Deixar sedimentar els organoids uns 10 minuts i llavors afegir el medi de cultiu lentament (veure apartat Medis de cultius) per facilitar la seva adhesió a la superfície del flascó.
- Mantenir a 37°C, 5% de CO₂ i atmosfera humida.
- Controlar la progressió del creixement cel·lular a partir dels organoids al llarg dels següents dies (Figura 28).

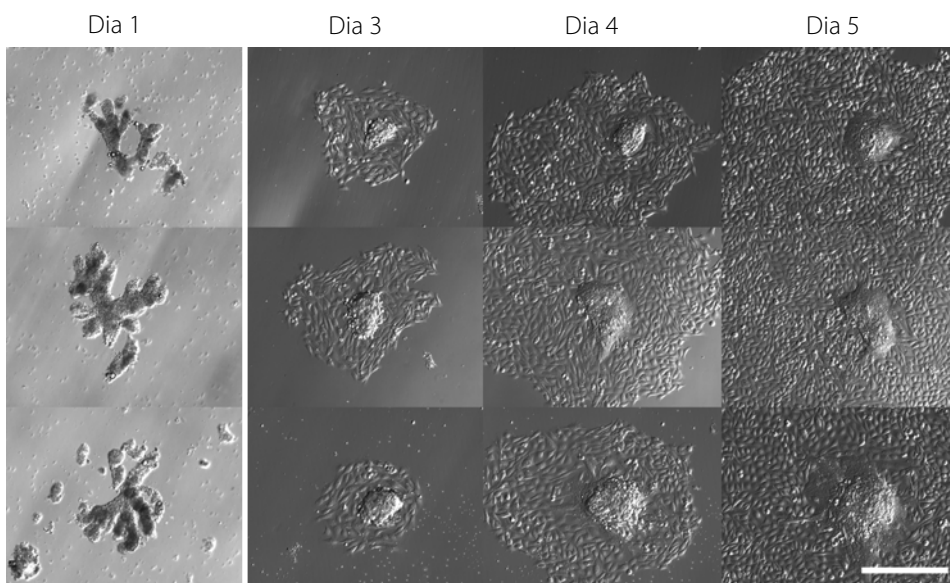


Figura 28. Creixement del cultiu primari a partir dels organoids. Dia 1: estructures obtingudes de la digestió mecànica i enzimàtica. Dia 3-5: Creixement de cèl·lules a partir d'organoids adherits. Barra d'escala: 500 µm.

Cultiu de les BPEC

Les BPEC són cèl·lules epitelials derivades de teixit mamari sa utilitzant una superfície especial (Primaria™; 734-0073, Corning®) i un medi definit anomenat WIT que, d'acord amb el laboratori que el va desenvolupar, té la capacitat de preservar en major grau algunes característiques de les cèl·lules luminals en comparació amb als medis estàndard pel cultiu de les cèl·lules epitelials mamàries (Ince *et al.*, 2007). Quan el cultiu es troba proper a la confluència cal subcultivar-lo. Per fer-ho es renta amb PBS 1X sense Ca⁺² ni Mg⁺², es desenganxen les cèl·lules incubant-les 5 minuts amb 0,25% de Tripsina-EDTA i es neutralitza l'acció de la tripsina amb medi. Es

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

resuspenen les cèl·lules fins aconseguir una suspensió homogènia que es centrifuga 5 minuts a 500 g. Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules precipitades en un volum conegut per tal de contar les cèl·lules recuperades amb un hemocítometre i sembrar el nombre de cèl·lules desitjat tenint en compte les proporcions descrites a la Taula 1.

Taula 1. Nombre de cèl·lules sembrades en funció de la l'àrea de cada superfície.

Tipus de sembra	Cèl·lules/cm ²	p35 (9,6 cm ²)	T25 (25 cm ²)	T75 (75 cm ²)	p100 (78,5 cm ²)
Mínim	8,0 x 10 ³	76.800	200.000	600.000	628.000
Ideal	1,2 x 10 ⁴	115.200	300.000	900.000	942.000
Confluent	8,0 x 10 ⁴	768.000	2.000.000	6.000.000	6.280.000

Per evitar que les cèl·lules que no s'han adherit dificultin el creixement de la resta, és recomanable canviar el medi el dia després de la tripsinització.

A mesura que augmenta el nombre de cèl·lules en cultiu també s'evidencien els efectes del seu metabolisme provocant un canvi del color de l'indicador de pH, en aquest cas roig de fenol. Per tal de mantenir l'homeòstasi del cultiu cal **renovar el medi** aproximadament cada 48 h. En el cas de les cèl·lules que han estat immortalitzades es pot fer cada 72 h.

Per tal de **criopreservar** els diferents cultius obtinguts, es tripsinitzen i es centrifuguen les cèl·lules per resuspendre-les en medi de congelació que es compon d'un 92,5% de sèrum boví fetal (FBS) i d'un 7,5% de dimetilsulfòxid (DMSO). Es dipositen els criotubs en un Mr Frosty® que conté isopropanol i permet refrigerar-los a una velocitat de -1°C/minut quan es deixa dins el congelador de -80°C, per posteriorment emmagatzemar-los en nitrogen líquid.

A l'hora de posar en cultiu les cèl·lules criopreservades, es descongela el contingut del criotub mantenint-lo a 37°C durant aproximadament 1 minut i es dilueix en medi de cultiu. Es centrifuga la suspensió de cèl·lules 5 minuts a 500 g per posteriorment aspirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en el medi de cultiu adient (veure apartat Medis de cultiu). Finalment s'aboca el medi amb les cèl·lules al flascó o placa de cultiu i es manté a 37°C, 5% de CO₂ i atmosfera humida.

Medis de cultiu

La composició de les diferents variants del medi WIT es detalla de forma exhaustiva a la l'article de Ince i col·laboradors publicat el 2007, on s'especifica quins són els compostos que formen el medi basal i els corresponents suplementes en funció de si es cultiven cèl·lules de cultiu primari (P), cèl·lules immortalitzades (I) o transformades (T). A continuació s'anomenen les variants del medi WIT i les seves principals característiques (Figura 29):

- WIT-P: Constituint per medi basal WIT suplementat amb insulina, EGF, hidrocortisona i toxina colèrica. S'utilitza per derivar i mantenir el cultiu primari.
- WIT-I: Conté la meitat de toxina colèrica que el medi WIT-P, sense cap altre suplement. És el medi utilitzat per mantenir en cultiu les cèl·lules immortalitzades.
- WIT-T: És el medi basal sense suplementes addicionals, utilitzat per cultivar les cèl·lules transformades o en procés de transformació.

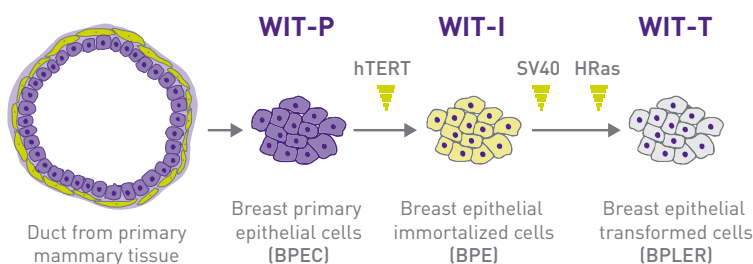


Figura 29. Esquema on s'especifica el tipus de medi utilitzat en funció del tipus cel·lular cultivat. Figura extreta de la fitxa informativa inclosa amb la compra del producte.

Disseny i producció de partícules lentivirals

Paral·lelament a la derivació dels cultius primaris, es van dissenyar i produir les partícules lentivirals a la Unidad de Vectores Virales del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III de Madrid (CNIC). A diferència dels retrovirus utilitzats en diferents models de transformació experimental (Elenbaas et al., 2001; Ince et al., 2007), l'ús de les partícules lentivirals de tercera generació permet la infecció de cèl·lules que no es troben en divisió millorant l'eficiència d'infecció, i una major seguretat evitant la generació de noves partícules amb capacitat replicativa.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

El procés de producció de les partícules lentivirals va consistir en dissenyar les clonacions amb l'ajuda del software lliure SnapGene Viewer, clonar els gens d'interès en vectors receptors lentivirals i posteriorment transfectar les cèl·lules HEK 293T per obtenir les partícules lentivirals (Figura 30).

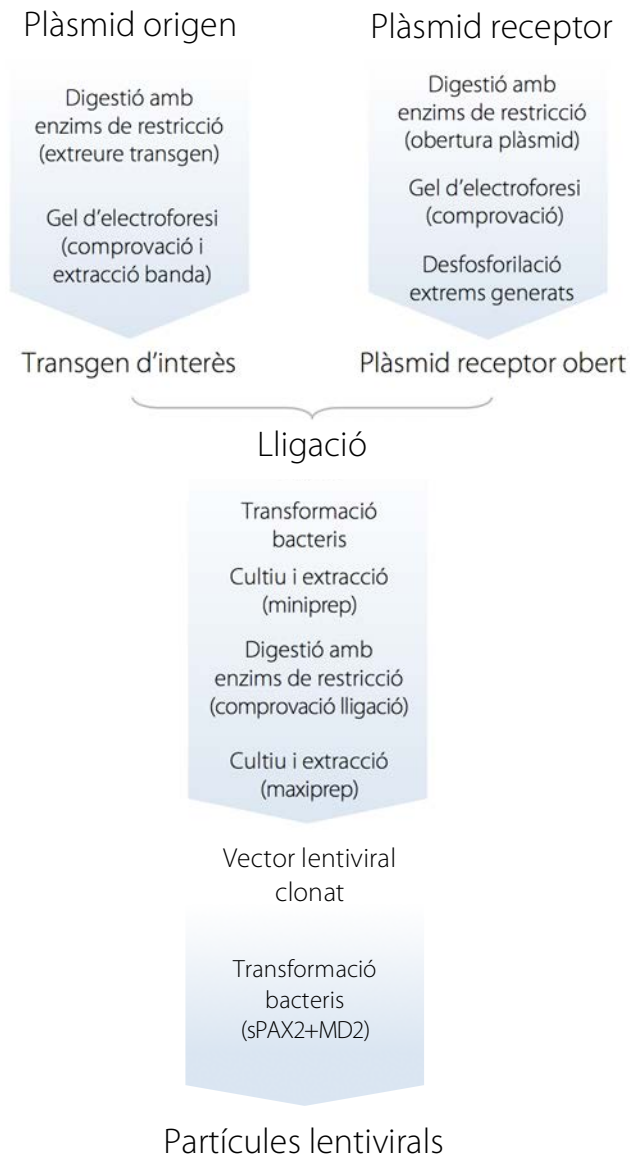


Figura 30. Esquema on es detallen els passos necessaris per clonar els gens d'interès en els vectors lentivirals i la posterior producció de partícules lentivirals.

Per tal d'alterar l'expressió dels gens d'interès i establir el model de transformació experimental en BPECs derivades dels cultius primaris, es van dissenyar dos tipus de partícules lentivirals diferents. Per una banda les que contenen els gens *Ttag* juntament amb *GFP*, i per l'altra les que contenen el gen *hTERT* i *mChFP*.

Clonació dels transgens *Ttag* i *hTERT* en vectors lentivirals

En primer lloc es van generar els vectors lentivirals que contenen la seqüència del gen d'interès i la del seu gen indicador. Per fer-ho es van extreure els transgens d'interès dels corresponents vectors d'origen i es van clonar en els vectors receptors lentivirals de tercera generació mitjançant digestions amb enzims de restricció (Figura 31).

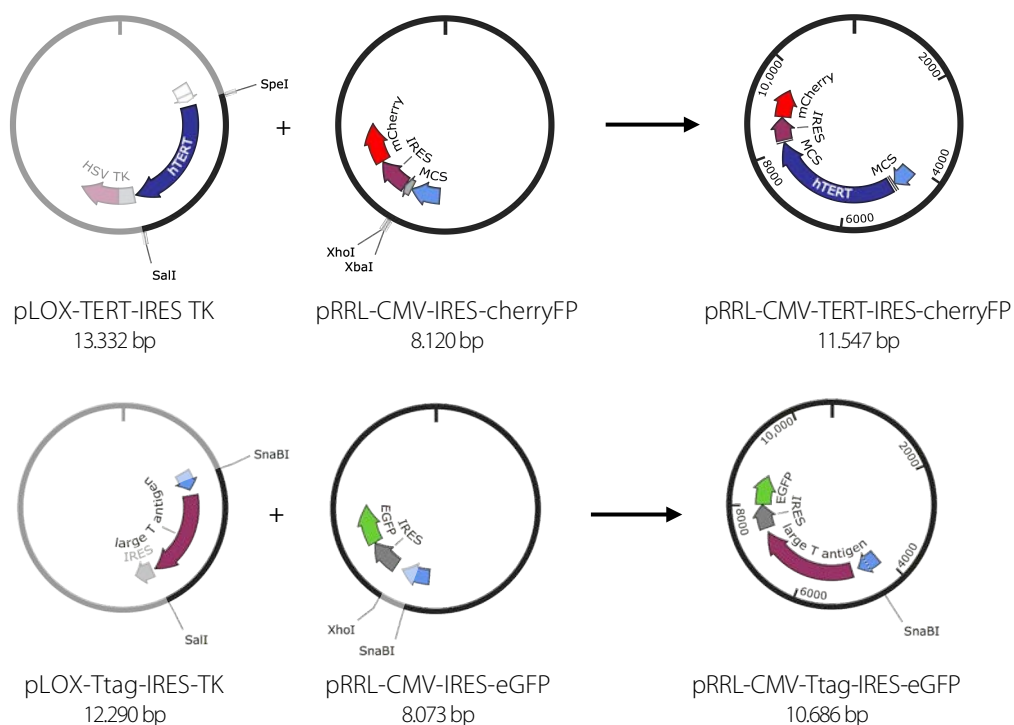


Figura 31. Esquema on es representen els plàsmids d'origen i els plàsmids receptors necessaris per a l'obtenció del vector lentiviral amb gen d'interès i gen indicador.

Els gens d'interès que contenen els **vectors d'origen** es van extreure mitjançant digestions amb els enzims de restricció detallats a la Taula 2.

Vector origen	Transgen	Enzims de restricció
pLOX-Ttag-IRES TK	<i>Ttag</i>	SnaBI i Sall
pLOX-hTERT-IRES TK	<i>hTERT</i>	SpeI i Sall

Taula 2. Vectors d'origen amb el transgen corresponent i enzims de restricció utilitzats per extreure'ls.

Totes les digestions es van dur a terme seguint les indicacions descrites pel fabricant (New England Biolabs) detallades a l'Annex. Es va procurar fer les digestions en una única reacció amb els dos enzims a la vegada. Quan la solució tampó d'un enzim no era compatible amb la de l'altre es van fer les dues digestions seriadades amb un pas de purificació entre les dues digestions utilitzant el kit QIAquick PCR Purification Kit (28104, Qiagen).

Es va separar el producte de la digestió del vector d'origen (DNA plasmídic) mitjançant una electroforesi horitzontal en gel d'agarosa a l'1% en TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA) per comprovar que la digestió s'havia produït correctament. El DNA plasmídic es va barrejar amb tampó de càrrega en una proporció 1:6 i es va carregar al gel juntament amb un marcador de pes molecular. Es va afegir l'agent intercalant bromur d'etidi per tal de poder visualitzar el DNA a través d'un transil·luminador de llum UV. Es va confirmar la correcta digestió identificant la banda del pes molecular esperat i es van extreure les bandes del gel corresponents als transgens *Ttag* i *hTERT* amb l'ajuda d'un bisturí.

Per purificar el fragment de DNA plasmídic de l'agarosa, es va utilitzar el QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen) seguint les instruccions descrites pel fabricant. El protocol consisteix a tractar el fragment d'agarosa amb una solució que a 58°C desfà l'agarosa i allibera el DNA. Després es precipita el DNA amb isopropanol, es renta i s'elueix utilitzant el tampó d'elució subministrat pels fabricants.

Els **vectors receptors (pRRL)** són vectors lentivirals de tercera generació i es caracteritzen per contenir una seqüència que codifica una proteïna fluorescent com a gen indicador. Un cop inserit el gen d'interès, l'estructura dels vectors receptors permet la transcripció dels dos gens (el d'interès i l'indicador), ambdós controlats pel promotor constitutiu de citomegalovirus (CMV). Per tal d'assegurar la traducció de l'RNA corresponent al gen indicador, entre els dos gens hi trobem la seqüència IRES (Internal Ribosome Entry Site). D'aquesta manera s'assegura la traducció del transgen inserit i de la proteïna fluorescent en una relació propera a 1:1.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Es van obrir els vectors receptors amb els enzims de restricció escollits específicament per generar extrems compatibles amb els extrems dels transgens que es volien introduir (Taula 3).

Vector lentiviral receptor	Enzims de restricció
pRRL CMV IRES eGFP	SnaBI i XhoI
pRRL CMV IRES cherryFP	XbaI i XhoI

Taula 3. Vectors lentivirals receptors i els enzims de restricció utilitzats per obrir-los.

Es va comprovar que la digestió dels vectors receptors s'havia realitzat correctament mitjançant una electroforesi horitzontal seguint el procediment explicat anteriorment i es van desfosforilar els extrems amb el kit Shrimp Alkaline Phosphatase (78390, Affymetrix-USB).

Per realitzar la **l·ligació** es va mesurar la quantitat de DNA plasmídic i de transgen amb espectrofotòmetre (NanoDrop2000, Thermo Scientific) per tal de barrejar-los en una proporció propera a 3:1 (Taula 4) juntament amb la l·ligasa T4 (70005, Affymetrix-USB), seguint les instruccions del fabricant.

Taula 4. Concentració obtinguda dels vectors lentivirals receptors i els seus respectius transgens que es van sotmetre a l·ligació.

Concentració del vector receptor		Concentració del transgen	
pRRL CMV IRES eGFP	0,16uM	<i>Ttag</i>	0,52uM
pRRL CMV IRES cherryFP	0,06uM	<i>hTERT</i>	0,23uM

Per tal de poder amplificar els dos productes de l·ligació, es van **transformar bacteris** competents STBL3 (C7373-03, Invitrogen) amb cadascun dels vectors l·ligats. Aquest procediment consisteix a barrejar els bacteris amb del producte de l·ligació i incubar 45 segons a 42°C per tal que el DNA entri a les cèl·lules per xoc tèrmic. Es van deixar créixer els bacteris a 37°C en plaques de LB sòlid amb 50ug/ml d'ampicil·lina durant tota la nit. Es van picar dues colònies de bacteris procedents de cadascun dels productes de l·ligació i es van incubar en 3ml de medi LB líquid amb ampicil·lina a 37°C durant tota la nit.

L'endemà, es va separar 1ml de bacteris de cada cultiu i els 2ml restants es van utilitzar per extreure els vectors utilitzant el Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (A1330, Promega). Per fer-ho es va seguir el protocol (miniprep) descrit pels fabricants que, breument, consisteix a:

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Resuspendre els bacteris en una solució de lisi que conté proteases alcalines per trencar restes de proteïnes del medi de cultiu i degradar nucleases o altres enzims que puguin malmetre el DNA plasmídic.
- Neutralitzar l'acció de les proteases i centrifugar la mostra per precipitar restes cel·lulars com membranes.
- Passar el sobrenedant en una columna que conté un filtre que permet retenir el DNA.
- Netejar el DNA utilitzant una solució de rentat.
- Eluir el DNA del filtre utilitzant aigua lliure de nucleases.

Per tal de comprovar si la lligació s'havia donat correctament es van digerir els vectors obtinguts amb els enzims de restricció detallats a la (protocol detallat a l'Annex).

Vector lligat	Enzims de restricció
pRR Cherry-hTERT	SnaBI i Sall
pRR GFP-Ttag	HpaI

Taula 5. Enzims de restricció utilitzats per fer la digestió de comprovació de la lligació de cada vector.

Una vegada comprovat amb un gel d'agarosa a l'1% que les digestions eren correctes, es van tornar a posar en cultiu els bacteris transformats que contenien els vectors lligats per tal d'aconseguir quantitats més grans del vector. Per fer-ho, es van cultivar 500 µl de la suspensió amb bacteris transformats en 100ml de medi LB amb 50ug/ml d'ampicil·lina a 37°C durant tota una nit. Els bacteris transformats restants es van congelar amb glicerol a una concentració final del 50%.

Per tal **d'extreure els plàsmids lentivirals** del cultiu de bacteris transformats es va utilitzar el kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (12163, Qiagen) seguint les instruccions dels fabricants. Breument, el protocol (maxiprep) consisteix a:

- Llisar els bacteris amb una solució rica en detergents i fosfatasa alcalina.
- Neutralitzar l'acció de la fosfatasa.
- Centrifugar per tal de separar les restes cel·lulars dels àcids nucleics.
- Posar el sobrenedant en una columna que conté un filtre per retenir el DNA.
- Rentar el DNA retintut a la columna amb una solució que conté MOPS per mantenir el pH constant, i 15% isopropanol.
- Eluir el DNA mitjançant una solució de NaCl, Tris-Cl i 15% isopropanol.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Precipitar el DNA eluït amb isopropanol 100%.
- Centrifugar el DNA a 20.000 g i descartar l'isopropanol.
- Rentar el pellet de DNA amb etanol al 70% i centrifugar per treure l'etanol.
- Deixar assecar el DNA i dissoldre'l amb aigua lliure de nucleases.

Per acabar, es va mesurar la concentració de DNA amb un espectrofotòmetre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Extracció i purificació del vector lentiviral HRasV12

En el cas de la transducció amb el gen *HRAS*, el vector que es va utilitzar va ser el plàsmid pLenti-CMV/TO-RasV12-Puro (w119-1), cedit pel Dr Eric Campeau a través d'Addgene (#22262). Es tracta d'un plàsmid lentiviral que conté el gen HRasV12 sota la regulació del promotor constitutiu CMV i el gen que confereix resistència a la puromicina (Figura 32).

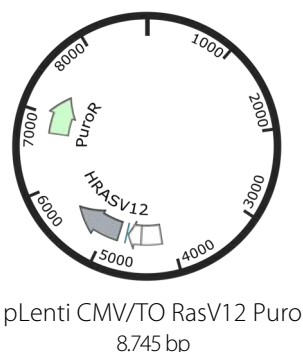


Figura 32. Esquema del plàsmid pLenti-CMV/TO-RasV12-Puro (w119-1).

El plàsmid pLenti-CMV/TO-RasV12-Puro es va rebre en format bacterià *stab*, un tipus de cultiu bacterià on els bacteris creixen en LB sòlid. Es va picar l'*stab* amb una punta de pipeta per sembrar els bacteris en una placa de LB sòlid amb ampicil·lina, el gen de resistència de les bacteries. El cultiu es va deixar durant una nit a 37°C i l'endemà es van picar dues colònies que es trobessin aïllades i que fossin d'una mida intermèdia. Aquestes colònies es van fer créixer en un cultiu de 3 ml de LB líquid durant una nit.

L'endemà es va extreure el plàsmid de 2ml del cultiu, la resta es va guardar a 4°C fins a saber el resultat de la digestió. Per extreure el plàsmid es va utilitzar el kit de miniprep seguint el protocol esmentat anteriorment. A continuació, es va fer una digestió diagnòstica amb *SpeI* i es van observar les bandes formades en gel d'agarosa per comprovar que el vector obtingut era el desitjat.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Un cop confirmada la lligació, es van posar en cultiu 500 µl del cultiu que s'havia reservat en 100ml de medi LB i es va congelar la resta del cultiu. L'endemà es va extreure el vector amplificat mitjançant el kit de maxiprep seguint el protocol esmentat anteriorment. Per últim, es va repetir la digestió amb SpeI per comprovar que el plàsmid extret era el correcte.

Producció de partícules lentivirals

A partir dels diferents vectors lentivirals es van generar les partícules lentivirals amb les que es van infectar les BPECs. Per fer-ho es van transfectar les cèl·lules HEK293T amb el vector lentiviral desitjat juntament amb pRSV-Rev i pMDLg/pRRE (plàsmids que contenen gens *Rev*, *Gag* i *Pol* involucrats en l'empaquetament de les partícules lentivirals) i pMD.2G (conté el gen VSV-G implicat en la formació de l'envolta del virus).

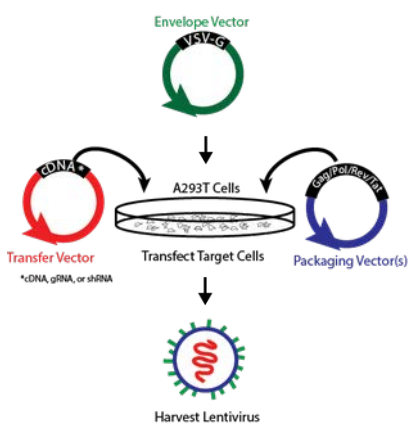


Figura 33. Esquema dels plàsmids transfectats a les HEK293T per dur a terme la producció de partícules lentivirals (Font: Guia lentiviral de Addgene).

Dos dies després d'haver transfectat les cèl·lules productores, es va recollir el medi de cultiu que contenia les partícules lentivirals generades i es va netejar centrifugant la suspensió per precipitar les restes cel·lulars que hi poguessin haver i recuperant el sobrenedant que conté les partícules lentivirals. Seguidament es va filtrar la suspensió amb filtres de PVDF de 0,45 µm de diàmetre i es va ultracentrifugar a 90.000 g durant 2 hores a 4°C.

Es va calcular el títol viral mitjançant citometria de flux en aquells casos que els vectors lentivirals contenien el gen d'alguna proteïna fluorescent, i mitjançant qPCR en el cas de HRasV12 associat amb el gen de resistència a la puomicina. En tots els casos el títol viral obtingut va ser d'entre 10^6 i 10^7 partícules/ml.

Model de transformació experimental

Un cop obtingut el cultiu de BPECs a partir de teixit mamari sa i produïdes les partícules lentivirals portadores dels gens d'interès es va procedir a la infecció i selecció de les cèl·lules per establir el model de transformació experimental.

Infeccions amb partícules lentivirals

Les infeccions es van realitzar al Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB.

El dia abans de realitzar la infecció es van sembrar 130.000 cèl·lules en una placa p35. L'endemà es va canviar el medi a les cèl·lules afegint medi amb 4ug/ml de polibrè, un polímer catiónic utilitzat per millorar l'eficiència d'infecció. Posteriorment es va inocular el cultiu amb el volum necessari de partícules lentivirals per tal d'infectar amb la MOI (*multiplicity of infection* o nombre de partícules virals per cèl·lula) desitjada: 2 en el cas de les partícules lentivirals *Ttag+GFP* i *hTERT+mChFP* i 1 en el cas de *HRAS+puromicina*.

Es van mantenir les cèl·lules a l'incubador a 37°C, 5% de CO₂ i atmosfera humida durant 24h. L'endemà es va rentar el cultiu dues vegades amb PBS 1X i es va afegir el medi de cultiu adient (veure apartat Medis de cultiu).

Selecció del cultiu infectat

Tot i que l'eficiència d'infecció amb partícules lentivirals acostuma a ser elevada, no totes les cèl·lules s'infecten correctament. Per tal de treballar amb una població de cèl·lules el més pura possible es van seleccionar les cèl·lules que expressaven el gen indicador (proteïna fluorescent o resistència a antibiòtic).

Selecció per citometria de flux

Per tal de recuperar únicament aquelles cèl·lules que expressaven la proteïna fluorescent indicadora de la correcta infecció, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van transportar en gel fins a la Unitat de FACS del CRG/UPF situada al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Allà es van separar i recuperar les cèl·lules mitjançant el citòmetre FACSAria II SORP equipat amb el software

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

FACSDiva (v6.1.2) (Figura 34) per posteriorment tornar-les a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona i posar-les en cultiu.

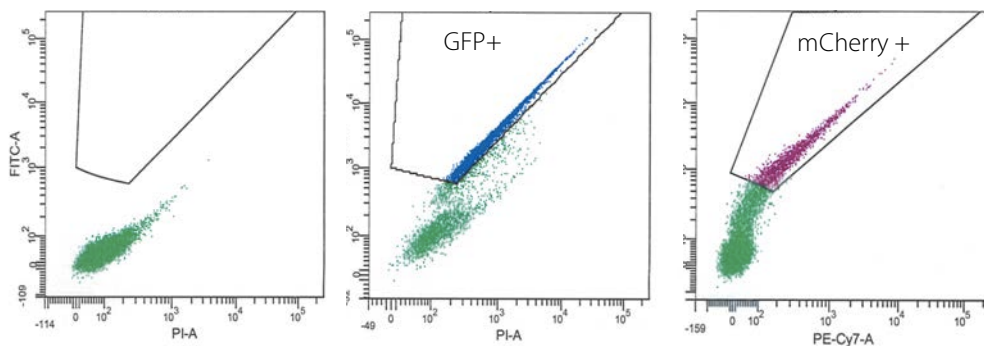


Figura 34. Dotplot on es mostra les cèl·lules no infectades sense fluorescència (esquerra) i les finestres de selecció per les cèl·lules fluorescents infectades amb *Ttag+GFP* (centre) i infectades amb *hTERT+mChFP* (dreta). Per excitar les proteïnes es fan utilitzar els làsers de 488 nm (eGFP) i 561 nm (mCherry).

Selecció amb antibiòtic

En el cas d'aquelles cèl·lules infectades amb partícules lentivirals que contenen el gen H-RasV12 (*HRAS*) juntament amb la resistència a puromicina es van seleccionar afegint puromicina al cultiu. D'aquesta manera es van eliminar les cèl·lules que no havien incorporat el gen que confereix resistència a l'antibiòtic.

En primer lloc es van testar diferents concentracions de puromicina (P8833, Sigma-Aldrich) per trobar la dosi mínima a la que moren les BPEC no infectades (resultats detallats a l'Annex), que va ser 0,8 ug/mL. Per tal de seleccionar aquelles cèl·lules infectades que contenen el gen de resistència a antibiòtic, es van cultivar en medi de cultiu suplementat amb 0,8 ug/ml de puromicina durant un mínim de 10 dies. Periòdicament es va repetir la selecció per confirmar que el cultiu seguia sent resistent a l'antibiòtic.

Comprovació de les infeccions

Un cop seleccionada la població de cèl·lules que presentava el gen indicador, ja fos proteïna fluorescent o resistència a antibiòtic, es va comprovar la presència del gen d'interès mitjançant la detecció de l'RNA missatger corresponent a la transcripció.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

La PCR quantitativa (qPCR) permet mesurar la quantitat de DNA i poder-ne comparar els nivells amb un DNA control. El seu fonament es basa en mesurar, al final de cada cicle d'amplificació de DNA, el nivell de fluorescència que emet un agent intercalant del DNA que s'afegeix a la reacció i que s'uneix només al DNA de cadena doble. En una mateixa mostra, aquelles seqüències que presentin més còpies necessitaran menys cicles per ser amplificades que aquelles que tenen menys còpies, les quals requeriran més temps per assolir els mateixos nivells de fluorescència.

En el nostre cas, enlloc de quantificar les seqüències presents al genoma, es van quantificar els nivells d'expressió d'aquests gens. Per fer-ho es va extreure l'RNA, es va precipitar i tractar amb DNasa per posteriorment convertir-lo a cDNA. A partir d'aquest cDNA i utilitzant oligonucleòtids específics, es van quantificar el nombre de còpies de les seqüències corresponents als gens d'interès.

Per extreure l'RNA dels diferents cultius es va seguir el següent protocol:

1. Sembrar les cèl·lules d'interès en un flascó T25.
2. Un cop confluent, aspirar el medi i afegir TRIzol® (15596-026, Thermo Fisher) per lliurar les cèl·lules i alliberar-ne el contingut.
3. Separar l'RNA de les proteïnes i del DNA amb cloroform.
4. Precipitar l'RNA amb isopropanol.
5. Rentar l'RNA amb etanol 70%.
6. Dissoldre l'RNA precipitat en aigua lliure de nucleases.
7. Tractar amb DNasa (Invitrogene, Carlsbad, CA) seguint el protocol especificat pels fabricants.
8. Inactivar la DNasa amb TRIzol® i tornar a precipitar l'RNA amb els passos de cloroform, isopropanol i etanol.
9. Resuspendre en aigua lliure de nucleases.
10. Quantificar els nivells d'RNA i la seva puresa amb l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
11. Retrotranscriure 1 µg d'RNA a cDNA mitjançant el kit iScript cDNA Synthesis (170-8891, Bio-Rad) seguint les instruccions dels fabricants.
12. Guardar el cDNA a -20°C i l'RNA a -80°C.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Per quantificar els nivells d'expressió que presentaven els diferents cultius es van dissenyar oligonucleòtids específics pels gens d'interès mitjançant el software Primer3 (seqüències d'oligonucleòtids detallades a l'Annex).

La qPCR es va realitzar utilitzant l'agent intercalant SYBR green (172-5124, Bio-Rad) i la lectura de la fluorescència a cada cicle es va fer mitjançant el termociclador CFX96 (Bio-Rad). Concretament, per cada reacció es van utilitzar 0,1ng de cDNA en presència dels oligonucleòtids (1uM) i es va sotmetre a 39 cicles d'amplificació. L'anàlisi dels resultats es va fer amb els softwares Bio-Rad CFX Manager i Microsoft Excel.

Per a cada corba d'amplificació es va obtenir el paràmetre *quantification cycle* o Cq, que indica el cicle a partir del qual es detecta un nivell de fluorescència indicador de la correcta amplificació. Valors de Cq més baixos indiquen menor nombre de cicles necessaris per amplificar el gen d'interès i per tant major expressió d'aquell gen en la mostra testada (Figura 35). Per cada mostra es va fer la reacció per triplicat i només es va considerar que hi havia expressió del gen d'interès quan la diferència entre les rèpliques era menor que 0,5 i la Cq mitjana entre les rèpliques era inferior a 30, ja que amplificacions a partir d'aquest punt poden ser producte d'unions inespecífiques.

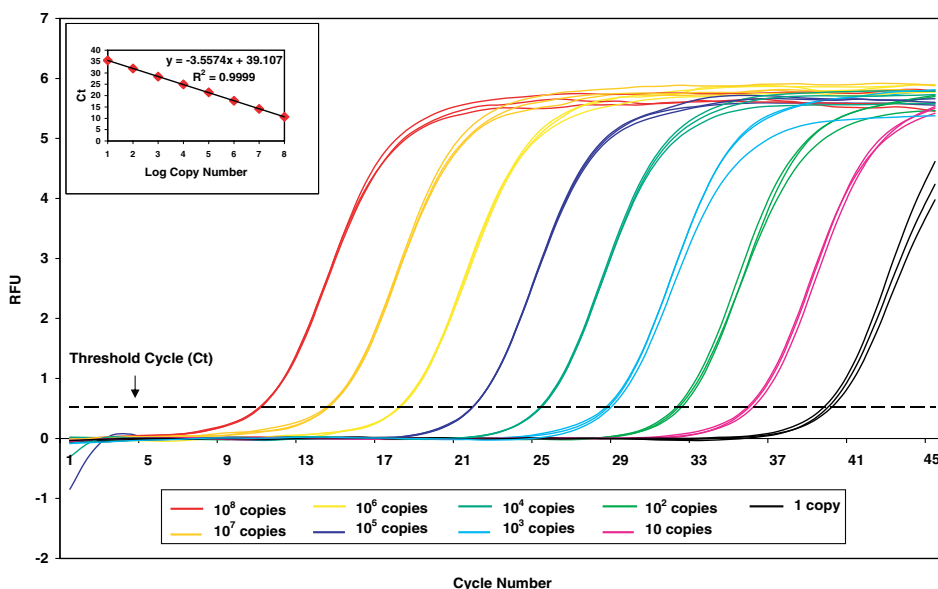


Figura 35. Exemple de corbes d'amplificació obtingudes al mesurar el mateix gen variant el nombre de còpies presents a la mostra. Les corbes s'obtenen al representar la fluorescència relativa (RFU) en funció del cicle d'amplificació.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Per comparar els nivells d'expressió entre les diferents mostres es va normalitzar l'expressió dels gens d'interès calculant la diferència entre la Cq del gen d'interès i la Cq del gen control GAPDH (ΔCq).

Ttag i *hTERT* són gens que no s'expressen de forma natural a les cèl·lules epitelials mamàries sanes. Per aquest motiu, el simple fet d'observar amplificació per aquests dos gens a les mostres provinents de cèl·lules infectades indica que s'havien introduït els gens d'interès al genoma i que aquests s'estaven expressant.

En el cas de *HRAS*, al ser un gen que presenta expressió endògena, es va calcular l'augment en l'expressió de *HRAS* en el cultiu infectat respecte el cultiu no infectat ($\Delta\Delta Cq$):

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(\text{cultiu infectat})} - \Delta Cq_{(\text{cultiu no-infectat})}$$

Per últim es va representar la diferència d'expressió entre un cultiu i l'altre mitjançant el paràmetre *fold change* (FC) calculat de la següent manera:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Irradiació dels cultius

L'exposició de les BPECs a diferents dosis de radiació ionitzant es va realitzar mitjançant l'irradiador IBL 437C equipat amb dues fonts radioactives de Cesi-137 disponible a la Unitat Tècnica de Protecció Radiològica (UTPR) de la UAB. Aquest dispositiu permet exposar les mostres a dosis controlades de rajos γ a una taxa de 5 Gy/min. En tots els casos es va incloure el control no irradiat en el transport de les mostres a les instal·lacions de l'UTPR.

Caracterització dels cultius

Un cop establerts els cultius i havent confirmat la correcta expressió dels gens d'interès, es va procedir a la caracterització de les cèl·lules dels diferents cultius per conèixer amb més detall quines propietats presentaven i poder entendre i interpretar el seu comportament.

Corbes de creixement

Per tal de valorar la cinètica de creixement dels diferents cultius utilitzats es va calcular el *Population Doubling* (PD) d'acord amb la fórmula següent:

$$PD = \frac{1}{\log 2} \times \log \left(\frac{\text{cèl·lules recollides}}{\text{cèl·lules sembrades}} \right)$$

Aquest paràmetre indica les vegades que s'ha duplicat el nombre de cèl·lules sembrades inicialment. Sumant els PD acumulats a cada tripsinització ens podem fer una idea del comportament d'aquestes cèl·lules al llarg del temps en cultiu de forma lineal (Figura 36B) i no pas exponencial com la corba que s'obté quan es representa el nombre de cèl·lules obtingudes al llarg del temps en cultiu (Figura 36A).

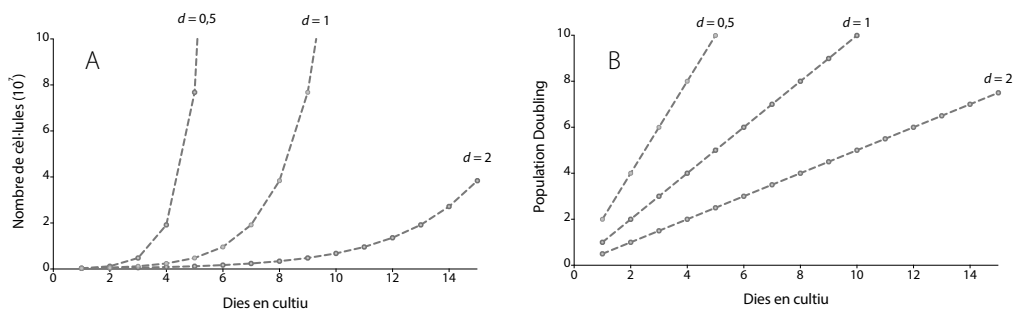


Figura 36. Creixement de cultius amb diferents temps de duplicació (d) al llarg del temps. A. Representació del nombre de cèl·lules. B. Representació del *Population doubling*.

Per tal de veure tendències en el creixement dels diferents cultius es va representar gràficament el valor acumulat de PD en funció del temps. D'aquesta manera una disminució en la proliferació es veu representada en una disminució en el pendent de la recta.

Quantificació dels nivells de proteïna

Donada la importància de p16 en l'aturada del creixement característica de les cèl·lules epitelials mamàries mantingudes en cultiu, es va voler detectar si s'estava expressant aquesta proteïna a diferents temps del cultiu de les BPECs. Per tal de veure si la inhibició s'havia donat de forma correcta es van irradiar les cèl·lules a 5 Gy de rajos γ i es van extreure les proteïnes 2 hores post-irradiació per valorar els nivells de p21, que s'expressa en resposta al dany en el DNA de manera p53-dependent.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Per tal de confirmar la presència de les proteïnes d'interès es va realitzar una immunodetecció per Western blot. Aquesta tècnica consisteix a separar les proteïnes en funció de la seva mida en un gel d'electroforesi i transferir-les a un suport sòlid per detectar-les amb anticossos específics.

Per obtenir les proteïnes necessàries per dur a terme el Western blot es va seguir el següent protocol:

- Sembrar cèl·lules en una placa p100.
- Quan el cultiu està subconfluent, aspirar el medi, rentar amb PBS 1X fred i aspirar-lo.
- Congelar la placa a -80°C.
- Treure la placa del congelador i mentre encara està congelada, afegir tampó de lisi RIPA (composició detallada a l'Annex).
- Afavorir l'alliberació del contingut de les cèl·lules amb l'ajuda d'un *scraper*.
- Sonicar les mostres per disgregar els grumolls i alliberar les proteïnes unides al DNA.
- Centrifugar les mostres sonicades 2 minuts a 12.000 g per fer precipitar restes cel·lulars com membranes.
- Quantificar la concentració de proteïna obtinguda amb el kit Pierce BCA Protein Assay (23227, Thermo Scientific).
- Desnaturalitzar les proteïnes posant-les a 70°C durant 10 minuts i posar-les directament en gel per mantenir-les desnaturalitzades.
- Carregar en un gel d'electroforesi amb un 10% de Bis-Tris (NP0302, ThermoFisher Scientific) 25 µg d'extracte proteic barrejat amb el tampó de càrrega en una relació 4:1.
- Separar les proteïnes segons el pes molecular mitjançant electroforesi programant una etapa inicial de 5 minuts a 80 V seguida d'una etapa de 40 minuts a 180 V.
- Transferir les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (LC2005, Live Technologies) a una potència de 30 V durant 90 minuts.
- Bloquejar la membrana amb PBS 1X i un 5% de BSA durant 1 hora.
- Incubar la membrana amb anticossos primaris específics per la proteïna d'interès diluïts en PBS 1X amb un 3% de BSA i un 0,1% Tween20 *overnight* a 4°C (Taula 6).
- Rentar la membrana amb TTBS 1X (composició detallada a l'Annex) per eliminar l'excés d'anticòs primari.
- Incubar amb anticossos secundaris conjugats amb HRP (*horseradish peroxidase*) diluïts en PBS 1X amb un 3% de BSA i un 0,1% Tween20 durant 1 hora a temperatura ambient (Taula 6).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Rentar l'excés d'anticòs secundari amb TTBS 1X.
- Afegir el substrat quimioluminiscent de l'HRP (WBKLS0500, Immobilon Western).
- Capturar la senyal amb un transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Taula 6. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per immunodetecció de proteïnes per western blot.

Anticòs	Referència	Hoste	Concentració
p16 ^{INK4a}	MS-218-P	Ratolí	1/200
Anti-GAPDH	Ab9484	Ratolí	1/1000
Anti-mouse (HRP)	12-349	Cabra	1/5000

Anàlisi citogenètiques

Tenint en compte que la transducció dels antígens *large T* i *small t* del virus de simi 40 (SV40) comporta la inactivació de p53 i pRb, fet que pot comprometre la integritat genòmica, es va voler caracteritzar el cariotip de cada línia cel·lular obtinguda.

Per tal d'aconseguir cèl·lules en metafase de cadascun dels cultius es va seguir el següent procediment:

- Sembrar les cèl·lules en flascó T75.
- Tractar amb Colcemid un màxim de 4 hores (15212012, Thermofisher Scientific) durant la fase de creixement exponencial del cultiu per tal d'acumular les cèl·lules en la fase M del cicle cel·lular.
- Tripsinitzar les cèl·lules i centrifugar-les.
- Resuspendre les cèl·lules gota a gota en solució hipotònica (KCl 0,075M).
- Fixar les cèl·lules amb Carnoy (3:1; metanol:àcid acètic).
- Preparar extensions sobre portaobjectes.
- Hibridar amb sondes específiques per detectar les seqüències centromèriques (sonda pancentromèrica Cent-FAM "FAM-OO-AAA CAC TCT TTT TGT AGA" de PANAGENE) i telomèriques (sonda pantelomèrica PNA-Cy3 "Cy3-CCCTAA", PE Biosystems) dels cromosomes.
- Contratenyir amb 0,25ug/ml de DAPI diluït en medi de muntatge Vectashield (H-1000, Vector Laboratories).

La valoració de les preparacions es va fer amb un microscopi d'epifluorescència (BX60, Olympus) equipat amb el software CytoVision GENUS (v3.93.2, Applied Imaging) amb el que es van capturar i cariotipar un mínim de 20 metafases per mostra.

Recompte de cèl·lules amb característiques mioepitelials i luminals

Igual que a la glàndula mamària, el cultiu de BPECs presentava una heterogeneïtat de tipus cel·lulars. D'acord amb el que descriu Weinberg i col·laboradors, el cultiu de cèl·lules derivades de glàndula mamària sana en medi WIT i superfície Primaria® permet una millor preservació de les característiques luminals en comparació als medis estàndard pel cultiu. No obstant això, també hi podrien romandre cèl·lules amb característiques mioepitelials.

Per tal de quantificar el nombre de cèl·lules d'un i altre llinatge presents als cultius es va realitzar una immunofluorescència per detectar citoqueratina 14 (K14) i claudina 4 (Cl4), marcadors específics de cèl·lules mioepitelials i luminals respectivament, en cèl·lules no infectades, cèl·lules infectades amb *Ttag* i *hTERT* i cèl·lules infectades amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*.

Per dur a terme la immunofluorescència es va seguir el següent procediment:

- Sembrar cèl·lules sobre cobreobjectes en plaques p35.
- Aspirar el medi i rentar amb PBS 1X.
- Fixar les cèl·lules amb metanol:acetona (1:1) durant 10 minuts a -20°C.
- Rentar les restes de fixador amb PBS 1X.
- Bloquejar amb PBS 1X amb un 5% de sèrum de cabra (NGS; S2000, Labclinics) i un 0,1% de Tritó X-100 durant 1 hora a temperatura ambient.
- Incubar els anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig *overnight* a 4°C (Taula 7).
- Rentar la solució d'anticòs primari amb PBS 1X durant 1 h a temperatura ambient.
- Incubar els anticossos secundaris diluïts en solució de bloqueig durant 2h a temperatura ambient (Taula 7).
- Rentar solució d'anticòs secundari amb PBS durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Deshidratar amb etanol a diferents concentracions progressivament decreixents, afegir 0,25ug/ml de DAPI diluït en medi de muntatge Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) i dipositar sobre un portaobjectes.
- Segellar el cobreobjectes amb esmalt d'ungles.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Taula 7. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en immunofluorescències 2D i 3D.

Proteïna (fluorocrom)	Referència	Hoste	Dilució 2D	Dilució 3D
Anti-citoqueratina 14	ab9220[RCK107]	Ratolí	1/1000	1/100
Anti-claudina 4	ab15104	Conill	1/1000	1/100
Anti-ratolí (Cy3)	JAC-115-165-146	Cabra	1/500	1/500
Anti-conill (488)	115-545-2050	Cabra	1/500	1/500

La visualització de les immunofluorescències es va fer mitjançant un microscopi d'epifluorescència (BX60, Olympus) amb el que es va realitzar el recompte manual de les cèl·lules positives per un i altre marcatge.

Mort radioinduïda

Per tal de conèixer la resposta de les BPECs davant l'exposició a altes dosis de radiació es van quantificar els nivells d'apoptosi i senescència després d'irradiar les cèl·lules amb 5 Gy de rajos γ a diferents moments del cultiu.

Quantificació dels nivells d'apoptosi amb el test TUNEL

- Aspirar el medi i rentar amb PBS 1X.
- Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 2% durant 40 minuts a temperatura ambient.
- Rentar les restes de fixador amb PBS 1X.
- Permeabilitzar les cèl·lules amb la solució de PBS 1X amb un 0,1% de Tritó X-100 i un 0,1% de citrat sòdic durant 5 minuts en gel.
- Rentar la solució de permeabilització amb PBS 1X.
- Incubar les cèl·lules amb la solució TUNEL mix del kit "In Situ Cell Death Detection, Fluorescein" (11684795910 ROCHE) que es conforma de 3 μ l d'Enzime i 27 μ l de Label solution durant 40 minuts a 37°C dins una càmera humida.
- Rentar la solució de TUNEL amb PBS 1X.
- Deixar assecat a temperatura ambient.
- Contratenyir amb 0,25 μ g/ml de DAPI diluït en medi de muntatge Vectashield (H-1000, Vector Laboratories).

La valoració del nombre de cèl·lules que presentaven senyal positiva pel marcatge TUNEL es va fer amb un microscopi d'epifluorescència (BX60, Olympus).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Quantificació dels nivells de senescència amb la mesura de l'activitat de la β -galactosidasa

- Aspirar el medi i rentar amb PBS 1X.
- Fixar amb formaldehid al 2% i glutaraldehid al 0,2% en PBS 1X durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Aspirar la solució de fixació i rentar amb PBS 1X.
- Incubar les cèl·lules amb la solució de tinció durant 13 hores a 37°C (composició detallada a l'Annex).
- Aspirar la solució de tinció i rentar amb PBS 1X.
- Rentar amb metanol durant 30 segons.
- Eliminar el metanol i rentar amb aigua destil·lada.
- Deixar assecar.

La valoració es va realitzar a través de la captura d'imatges amb un microscopi òptic invertit amb contrast de fase (IX71, Olympus) i el recompte de cèl·lules positives pel senyal blau característic de les cèl·lules senescentes amb el Plugin *Cell counter* del software Fiji (ImageJ; Schindelin et al., 2012).

Anàlisi del perfil d'expressió gènica (PAM50)

Per tal de quantificar els nivells d'expressió de gens utilitzats per classificar dels subtipus de càncer de mama es va establir una col·laboració amb el Grup de Genòmica Translacional de l'Institut d'Oncologia de la Vall d'Hebron liderat pel Dr Aleix Prat.

Preparació de les mostres

L'RNA de les mostres es va extreure seguint el protocol descrit a l'apartat "Comprovació de les infeccions". Per cada mostra es va destinar un volum de 15 μ l d'RNA a una concentració de 100 ng/ μ l a realitzar els triplicats en l'anàlisi PAM.

La quantificació de l'expressió dels diferents gens inclosos al PAM es va fer mitjançant la plataforma nCounter de NanoString. Aquest mètode es basa en una tecnologia innovadora que utilitza sondes marcades amb oligonucleòtids fluorescents ordenats en un ordre concret. Les diferents combinacions de colors i posicions generen una gran quantitat de codis de barres cadascun d'ells assignat específicament a un dels gens d'interès. Aquestes sondes s'hibriden amb l'extracte d'RNA provinent de mostres, teixits frescos o parafinats i, després d'una incubació

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular a 65°C, es fa un recompte de les molècules d'RNA unides a les sones obtenint el nombre total de trànscrips que presenta cadascun dels gens.

Algunes de les característiques més destacades d'aquesta metodologia són el processat automatitzat de les mostres i que no es requereix ni amplificació ni reacció enzimàtica, fet que simplifica el funcionament de la tècnica. Per aquests motius es poden obtenir els resultats de l'anàlisi en només 48 hores.

Interpretació resultats

Un cop obtingut el nombre de còpies (*counts*) de cadascun dels 50 gens analitzats a les diferents mostres per triplicat, es va realitzar un anàlisi bioinformàtic per detectar diferències en el nivell d'expressió relacionades amb els elements gènics transduïts o amb l'exposició a radiació ionitzant.

L'anàlisi estadístic realitzat per experts en el tractament dels resultats obtinguts en el mètode PAM del Grup de Genòmica Translacional consisteix en primer lloc a normalitzar els *counts* obtinguts pels gens d'interès en funció dels *counts* d'aquells gens d'expressió constitutiva (*housekeeping*) inclosos a l'anàlisi (llista dels gens inclosos a l'anàlisi detallada a l'Annex). Concretament es calcula la mediana geomètrica dels gens *housekeeping* per a cada mostra i es divideix el nombre de *counts* obtinguts de cada gen per aquest valor normalitzador. En segon lloc, es realitzen comparatives aparellades de les mostres per identificar aquells canvis d'expressió estadísticament significatius especificats en l'apartat d'anàlisis estadístiques.

Cultius tridimensionals en Matrigel

Per tal de valorar la capacitat dels diferents cultius de créixer en presència d'una matriu extracel·lular i formar estructures organitzades es van establir cultius tridimensionals en Matrigel seguint la metodologia *on-top*.

Sembra i cultiu

El Matrigel és un producte que es troba en estat líquid a 4°C però solidifica per sobre de 10°C. Per aquest motiu la manipulació del Matrigel cal fer-la en tot moment amb material fred.

- Descongela una alíquota de Matrigel *overnight* a 4°C.
- Rentar el pou d'una placa de 24 pouets amb PBS 1X estèril fred.
- Dipositar 100 µl de Matrigel (354234, BD Biosciences) i deixar solidificar-lo a 37°C. És important evitar la formació de bombolles. Un cop solidificat el Matrigel es formarien cavitats que permetrien a les cèl·lules créixer-hi adherides.
- Tripsinitzar les cèl·lules i diluir-les per tal d'aconseguir una suspensió de 100.000 cèl·lules en 500 µl de medi amb un 4% de Matrigel.
- Dipositar el medi amb les cèl·lules sobre la capa de Matrigel prèviament solidificat.
- Mantenir a 37°C, 5% de CO₂ i atmosfera humida.
- Aspirar el medi sense tocar la capa de Matrigel i afegir novament 500 µl de medi amb un 4% de Matrigel entre 2 i 3 cops per setmana.

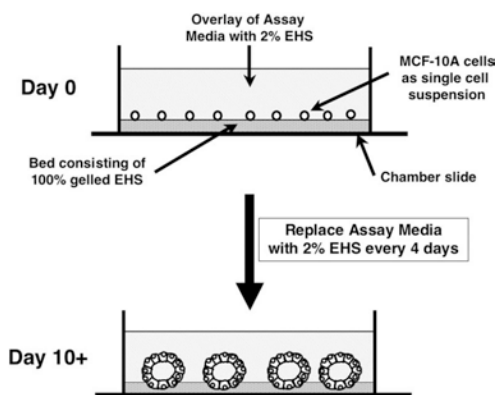


Figura 37. Creixement *on-top* d'acini en cultiu tridimensional en Matrigel (Debnath J et al, 2003)

Valoració del creixement i el nombre dels acini formats

Per tal de valorar la correcta formació i cinètica de creixement dels acini en cultius tridimensionals en Matrigel es van capturar imatges de camps aleatoris a diferents temps (0, 1, 7 i 14 dies després de la sembra) amb un microscopi òptic invertit amb contrast de fase (IX71, Olympus). Es va mesurar el diàmetre d'entre 150 i 200 acini presents a les imatges mitjançant el software Fiji (Figura 38).

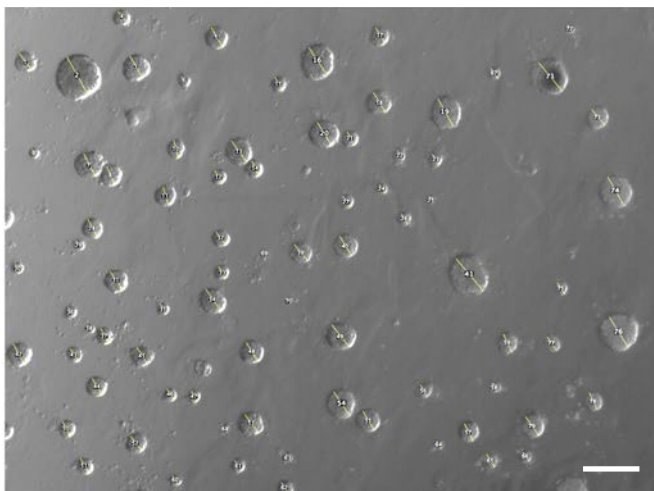


Figura 38. Imatge representativa del procés de mesura del diàmetre dels acini. Barra d'escala 200 μm .

Transcorregudes dues setmanes en cultiu, es va quantificar manualment el nombre d'acini formats mitjançant visualització amb el microscopi òptic invertit (IX71, Olympus) i es va processar el material per procedir amb la immunofluorescència del acini formats.

Per tal de valorar el creixement dels acini durant les primeres hores en cultiu es va fer un time-lapse al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona. La captura de les imatges es va fer mitjançant un confocal Leica TCS SP5 equipat amb una cabina per mantenir el nivell de CO_2 al 5% i una temperatura constant de 37°C . Es van realitzar imatges cada 10 minuts durant les primeres 15 hores de cultiu. El processat de les imatges es va fer amb el programa LAS AF (Leica) i Fiji (ImageJ).

Detecció immunofluorescent de proteïnes en cultius tridimensionals

Per tal de localitzar les cèl·lules amb característiques mioepiteliales i luminals dins els acini es va fer una immunodetecció per citoqueratina 14 i claudina 4 emprant els mateixos anticossos utilitzats per fer el recompte de cèl·lules d'aquests llinatges en cultius 2D (Taula 7). En aquest cas es va seguir el següent procediment:

- Aspirar el medi que hi ha a sobre la capa de cèl·lules en Matrigel.
- Tallar la punta d'una pipeta de 200 μl i disgregar el Matrigel polimeritzat mitjançant una combinació d'aspiració i raspai.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Repartir uns 50 µl de la suspensió d'acini en Matrigel sobre els portaobjectes en una àrea d'uns 1-2 cm².
- Deixar assecar el Matrigel a temperatura ambient o sobre una placa calefactorsa per accelerar el procés.
- Fixar la mostra amb metanol:acetona (1:1) a -20°C durant 30 minuts.
- Bloquejar amb PBS amb un 5% de NGS i un 0,1% de Triton X-100 durant 2 hores a temperatura ambient.
- Afegir els anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig i cobrir la zona amb Parafilm® per evitar que s'evapori la solució (Taula 7).
- Incubar els anticossos primaris a 4°C *overnight* dins d'una cambra humida.
- Rentar tres vegades amb PBS 1X durant 1 hora (3 hores en total).
- Afegir els anticossos secundaris diluïts en solució de bloqueig i cobrir la zona amb Parafilm®.
- Incubar els anticossos secundaris a 4°C *overnight* dins d'una cambra humida (Taula 7).
- Rentar l'anticòs secundari amb PBS 1X durant 2 hores a temperatura ambient.
- Deixar assecar la mostra i afegir 0,25ug/ml de DAPI diluït en medi de muntatge Vectashield (H-1000, Vector Laboratories).
- Tapar amb un cobreobjectes i segellar amb esmalt d'ungles.

Valoració de les immunofluorescències en cultius tridimensionals

Les estructures formades per les cèl·lules cultivades en Matrigel es van valorar amb un microscopi de rastreig làser confocal Zeiss LSM 700 a les instal·lacions de l'Institut de Neurociències de la UAB. El rastreig de la mostra es va realitzar excitant els fluorocroms amb una bombeta de mercuri amb el sistema de visualització manual. Un cop identificada la zona en què es trobaven els acini, es va utilitzar el control automatitzat de l'aparell a través del software ZEN 2010 B BP1.

Les condicions de captura es van configurar d'acord amb paràmetres recomanats pel personal responsable de l'equipament, ajustant-les a cada sessió per obtenir una millor visualització de les mostres. La intensitat dels làsers es va mantenir entre el 0,2 i el 5% de la seva potència mentre que el paràmetre Gain, amplificador del senyal que rep el fotomultiplicador, es va mantenir entre els valors 600 i 800.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

La visualització en mode lineal va permetre excitar amb làsers diferents i observar conjuntament els tres canals utilitzats (K14 en vermell, Claudina 4 en verd i DAPI en blau). D'aquesta manera la valoració de cadascun dels acini es va fer de forma manual valorant tots els plans que comprenien el seu volum. Això va permetre assegurar la correcta integritat dels acini abans de considerar-los aptes per ser inclosos a l'anàlisi de la polaritat. Únicament es van considerar polaritzats aquells acini que presentaven cèl·lules positives pel marcatge de citoqueratina 14 a la perifèria juntament amb un marcatge positiu per claudina 4 al centre.

La visualització i posterior edició de les imatges per obtenir les figures incloses en aquest treball es va fer amb el software Fiji (ImageJ).

Test de creixement independent d'ancoratge

El test de creixement independent d'ancoratge permet esbrinar si les cèl·lules han adquirit la capacitat de créixer en suspensió. Per fer-ho es cultiven les cèl·lules en agar sòlid per tal que quedin individualitzades i que no s'adhereixin a la superfície. Passat un temps en cultiu es valora la seva capacitat de formar colònies.

Sembra i cultiu

Per tal de manipular l'agar i mantenir l'esterilitat del cultiu es va autoclavar una solució de 1,2% d'agar (A1296, Sigma-Aldrich) dissolt en aigua milli-Q. Per evitar que solidifiqués, es va mantenir la solució d'agar autoclavada a 42°C durant tot el procés de sembra, que breument consisteix a:

- Preparar medi de cultiu amb un 0,6% d'agar barrejant a parts iguals medi i agar 1,2%.
- Dipositar una capa de medi amb agar al 0,6% i deixar-la solidificar.
- Tripsinitzar les cèl·lules i diluir-les a una concentració coneguda.
- Preparar una suspensió de 25.000 cèl·lules/ml diluïdes en medi amb agar al 0,3% passant les cèl·lules per un filtre de 40 µm de diàmetre.
- Dipositar 1ml del medi amb agar al 0,3% que conté les cèl·lules a sobre de la capa de medi amb agar al 0,6% solidificada.
- Mantenir a 37°C, 5% de CO₂ i atmosfera humida.
- Afegir medi sobre la capa que conté les cèl·lules un cop estigui solidificada.
- Aspirar el medi sense tocar l'agar i afegir-ne de nou 2 o 3 vegades per setmana.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Al cap de 3 setmanes, aspirar el medi i afegir 1mg/ml de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) durant 24h.
- Aspirar l'MTT i guardar a 4°C evitant el contacte amb la llum.

Identificació, recompte i mesura de colònies

Únicament aquelles cèl·lules capaces de proliferar en suspensió formen colònies en agar (Figura 39). Passats els 21 dies, les cèl·lules que estan vives metabolitzen l'MTT i el transformen en cristalls visibles al microscopi (Figura 39).



Figura 39. Colònia al cap de 21 dies creixent en agar (barra d'escala 50 µm).

Per quantificar el nombre i la mida de les colònies formades en agar es va rastrejar tota la superfície capturant imatges com la que s'observa a la

Figura 40 amb un microscopi invertit (IX71, Olympus) per mesurar l'àrea de cada colònia mitjançant el software lliure Fiji (Schindelin et al, 2012). Tenint en compte que per cada cultiu es generaven un elevat nombre d'imatges, el procés d'anàlisi es va semi-automatitzar creant un *script* dins l'entorn Fiji (codi detallat a l'Annex). Això va permetre analitzar massivament les imatges de forma automàtica controlant els ajustaments manualment per cada imatge i obtenir els resultats de cada colònia de forma individual.

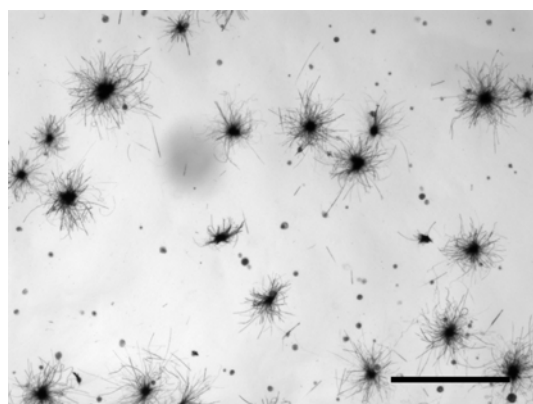


Figura 40. Colònies MTT positives visualitzades al microscopi invertit (Barra d'escala 500µm).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Els experiments es van realitzar per duplicat i, després de comprovar que no presentaven diferències, es van agrupar els valors de les dues rèpliques per representar-los conjuntament en un sol gràfic de punts per cada mostra (Figura 41).

A partir dels valors d'àrea de cada colònia (A) es va estimar el diàmetre mitjà (D) d'acord amb la següent fórmula:

$$D = 2 \sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

Es va calcular el radi teòric (R) que ha de presentar una colònia formada per n cèl·lules tenint en compte el radi de les cèl·lules (r) i l'eficiència d'empaquetament (ρ) d'aquestes d'acord amb la següent fórmula:

$$R = \sqrt[3]{\frac{n}{\rho}} r$$

Es van tenir en compte només aquelles colònies que presentaven com a mínim 8 cèl·lules (3 divisions en 3 setmanes). Es va mesurar el diàmetre de les BPECs en suspensió i es va observar que de mitjana mesuraven entre 14 i 15 μm . Per últim, es va considerar una eficiència d'empaquetament aleatori (0,64). Per tant, es van descartar de l'anàlisi aquelles colònies que presentaven un diàmetre inferior a 65 μm (Figura 41B).

La representació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de la mida de les colònies formades es va fer mitjançant un diagrama de punts de densitat simètrica que comprenia la suma dels valors obtinguts a dues rèpliques amb la mediana dels valors superiors a 65 μm (Figura 41D).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

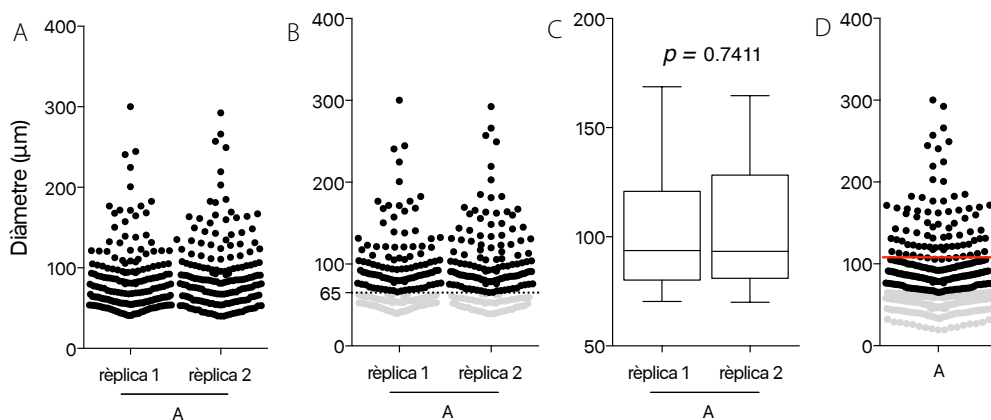


Figura 41. Representació del procés d'obtenció de dades referents a la mida de les colònies crescudes en agar. Gràfics de punts de tots els valors obtinguts (A), valors filtrats a partir de 65 µm (B), comparativa de les dues rèpliques amb el test de Mann-Whitney (C) i producte final resultat de la suma de les rèpliques (D).

Anàlisi estadístiques

Per tal d'analitzar si els resultats eren estadísticament significatius es van aplicar diferents tests en funció de les dades obtingudes i la seva distribució, utilitzant el programa informàtic GraphPad Prism v7.0a (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

La comparació del pendent de les corbes de creixement dels diferents cultius es va dur a terme mitjançant l'anàlisi de regressió lineal amb l'estadístic F amb un interval de confiança del 99%.

Per tal de fer les comparacions del ROR, el *Proliferation Score* i la mida de les colònies formades en agar es va utilitzar el test no paramètric Kruskal-Wallis assumint un error inferior al 5% i amb correcció per múltiples comparacions amb el mètode de Benjamini-Krieger-Yekutieli quan es requeria.

Les comparacions entre els nivells d'expressió dels gens analitzats al PAM es van realitzar utilitzant la prova *t* de Student. Es van considerar estadísticament significatius aquells canvis d'expressió que presentaven un valor *p* inferior a 0,05 i un *False Discovery Rate* (FDR) inferior a un 5%. El FDR és un mètode innovador desenvolupat el 1995 que permet mantenir la proporció de descobriments (casos en el que es rebutja la hipòtesi nul·la) a mesura que es generen noves comparacions (Benjamini i Hochberg, 1995). Aquest mètode té un major poder estadístic en

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular comparació a altres mètodes extensament utilitzats, com la correcció de Bonferroni per múltiples comparacions, sense comportar una disminució tant acusada de l'error assumible.

Del conjunt de gens analitzats al PAM amb alteracions significatives en l'expressió, es va restringir l'anàlisi a aquells gens diferentment expressats que presentaven un $\log_2(\text{Fold Change})$ superior a 1 o inferior a -1.

L'anàlisi de la mida dels acini al llarg del temps en cultiu es va realitzar mitjançant el test ANOVA de dues vies amb correcció de Tukey per a múltiples comparacions, considerant estadísticament diferents aquells resultats amb un valor p inferior a 0,05.

Per últim, es va utilitzar el test exacte de Fisher amb un 95% de confiança per tal de valorar les diferències en el nombre d'acini que presentaven una correcta polarització i les diferències en el nombre de colònies formades en agar tou pels diferents cultius analitzats.

Resultats

Establiment i caracterització dels cultius

Per tal d'estudiar l'efecte de la radiació sobre cèl·lules epitelials mamàries humanes en procés de transformació es van establir cultius primaris a partir de teixit mamari sa provinent de mamoplàsties per posteriorment infectar-los amb partícules lentivirals necessàries per iniciar el procés de transformació de forma experimental. Un cop establerts es van caracteritzar els cultius per tal d'assegurar que el procés tant d'establiment com de transducció s'havia produït correctament.

Establiment dels cultius primaris

Es va escollir derivar cultius primaris de cèl·lules epitelials mamàries humanes donat que el teixit mamari és amb freqüència objecte de procediments medico-diagnòstics que impliquen l'exposició a radiació ionitzant. Això fa que sigui un teixit de risc davant possibles efectes carcinogènics derivats de la radiació. Per altra banda, la major part dels càncer de mama s'originen en aquest tipus cel·lular i no d'altres presents a la mama com els fibroblasts o els adipòcits. Per últim, les mostres de teixit humà sa destinades a la recerca són escasses i sovint de difícil obtenció. En aquest aspecte, degut a l'elevat nombre de cirurgies estètiques de pit, el teixit mamari és un dels que se'n poden obtenir mostres no patològiques a partir de les que es poden derivar cultius primaris.

A partir del teixit mamari provinent de dues donants sanes es van establir dos cultius primaris de BPECs. Per fer-ho es va disgregar mecànicament i enzimàticament el teixit mamari i es va cultivar en medi WIT-P sobre superfície Primària. Weinberg i col·laboradors van descriure aquest mètode de cultiu destacant l'absència d'indicadors d'estrès cel·lular i l'enriquiment d'una població de cèl·lules amb característiques luminals (Ince *et al.*, 2007). Aquest fet és rellevant en primer lloc perquè es milloren les condicions de les cèl·lules en cultiu, i en segon lloc perquè justament la majoria d'adenocarcinomes de mama corresponen al subtipus luminal.

Les cèl·lules epitelials mamàries que es van derivar a partir del teixit mamari sa van presentar una morfologia aplanada, poligonal i heterogènia, formant petites agrupacions (Figura 42A). Aquestes característiques concorden amb la descripció de cèl·lules epitelials mamàries feta per Stampfer i col·laboradors el 1980. A partir del recompte de les cèl·lules recuperades a cada subcultiu es va calcular el *Population doubling* (PD) i es va representar la seva evolució al llarg del temps per veure la cinètica de creixement de cada cultiu (Figura 42B).

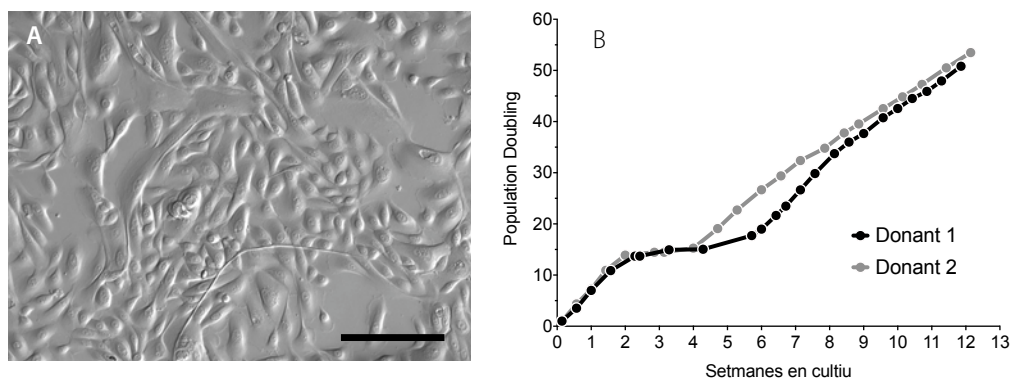


Figura 42. Creixement dels cultius de BPECs. **A.** Imatge d'un cultiu de BPEC creixent en medi WIT-P sobre superfície Primària (barra d'escala 100 µm). **B.** Cinètica de creixement dels cultius cel·lular obtinguts de les dues donants representant el *Population doubling* acumulat en funció de les setmanes en cultiu.

Durant les dues primeres setmanes en cultiu, les cèl·lules derivades tant de la mostra de la donant 1 com de la donant 2 van presentar un creixement exponencial constant. A la tercera i quarta setmana es va observar una aturada en el creixement que concorda amb el procés de senescència induïda per estrès en cultiu anomenat estasi (**Figura 42B**). En aquesta etapa, evidenciada per la disminució de la taxa de proliferació, la majoria de cèl·lules presentaven nombroses vacuoles i un augment de la mida, fets que coincideixen amb la descripció de cèl·lules epitelials mamàries senescentes feta per Stampfer el 1985 (**Figura 43A**).

Quan les cèl·lules portaven aproximadament un mes en cultiu es va observar un augment de la proporció de cèl·lules petites i refringents, algunes d'elles en divisió, anomenades cèl·lules post-estasi. Durant les successives tripsinitzacions, el nombre de cèl·lules amb morfologia senescent va anar disminuint fins que només es van mantenir en cultiu les cèl·lules petites i d'aspecte més homogeni (**Figura 43B**).

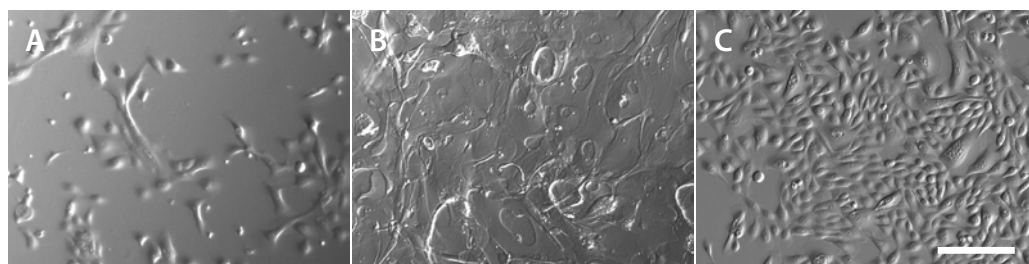


Figura 43. Imatges de diferents estadis del cultiu de BPECs. **A.** Cultiu previ a l'estasi. **B.** Cèl·lules en estasi. **C.** Cèl·lules que han superat l'estasi. Barra d'escala: 200 µm.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

En resum, tot i que el grup de Weinberg assegura que no s'observa cap aturada en el creixement de les cèl·lules epitelials degut a estrès en cultiu quan es cultiven en medi WIT sobre superfície Primària, es va observar una clara disminució de la taxa proliferativa quan les cèl·lules provinents de les dues donants portaven 3 setmanes en cultiu (Figura 42B); fet que ja havia estat prèviament descrit en BPECs per aquest mateix grup (Feijoo *et al.*, 2016). Aquesta aturada va ser idèntica a la que s'observa en els cultius de cèl·lules epitelials mamàries utilitzant el medi i superfície convencionals, indicant que el medi de cultiu WIT i la superfície Primària no van ser suficients per evitar l'estasi deguda a l'estrès en cultiu.

Per tal de confirmar que les variacions en el creixement del cultiu de les BPECs eren degudes a l'estasi dependent de l'expressió de p16, es van obtenir extractes proteics del cultiu a diferents moments: previ a l'estasi (PD 1), durant l'estasi (PD 19) i havent superat l'estasi (PD 72). Els resultats van indicar que la presència de p16 es limitava a aquelles cèl·lules cultivades abans o durant l'estasi. Un cop superada aquesta aturada no es va detectar p16. L'exposició a 5 Gy de rajos γ no va afectar els nivells de p16 en cap de les mostres analitzades dues hores post-irradiació (Figura 44).

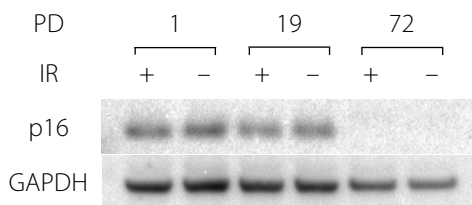


Figura 44. Western blot de p16 i GAPDH en extractes proteics extrets de les cèl·lules provinents de la donant 2 a diferents *Population Doubling* (PD) 2 hores després d'exposar-les a 5 Gy de radiació ionitzant (IR).

Creixement i transducció de les BPECs

La visualització del cultiu i l'anàlisi de la seva morfologia permeten conèixer l'estat en què es troben les cèl·lules i identificar canvis en el seu comportament. Tot i així, la percepció que s'obté de visualitzar de forma puntual un cultiu cel·lular no permet identificar tendències prolongades en el temps. Una manera d'obtenir informació sobre l'evolució del cultiu és representant la cinètica de creixement al llarg del temps per identificar fluctuacions en el seu creixement que poden passar inadvertides al dia a dia.

A partir del nombre de cèl·lules sembrades inicialment i el recompte de les cèl·lules recuperades a cada tripsinització es va calcular el *Population doubling* (PD) de cada cultiu tal com es descriu a

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

l'apartat de Material i mètodes titulat "Corbes de creixement". Representant els valors acumulats al llarg dels dies en cultiu es van obtenir les corbes de creixement representades a la **Figura 45**. En elles s'hi pot observar com les cèl·lules obtingudes a partir dels cultius primaris es van transduir amb *Ttag* i *hTERT*, per obtenir cèl·lules parcialment transformades, i per últim amb *HRAS* per obtenir cèl·lules plenament transformades.

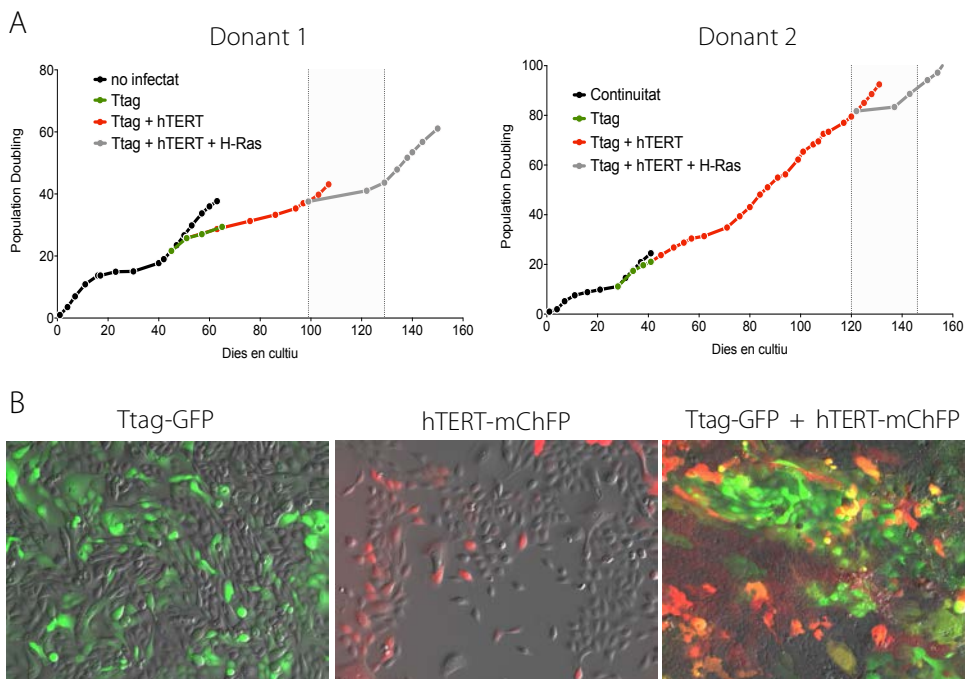


Figura 45. Creixement i fenotip dels diferents cultius obtinguts a partir del teixit mamari de les donants 1 i 2. **A.** Cinètiques de creixement on s'observa la progressió de les cèl·lules sense infectar (negre) i el moment de les infeccions amb *Ttag* (verd), *hTERT* (vermell) i *HRAS* (gris), així com el creixement de les cèl·lules infectades. L'àrea ombrejada indica el període de temps en que les cèl·lules es van seleccionar amb puromicina (0,8 mg/ml). **B.** Imatges representatives de BPEC infectades amb *Ttag-GFP*, *hTERT-mChFP* i ambdós vectors lentivirals. A les imatges se sobreposa la captura obtinguda amb contrast de fase i la d'epifluorescència per visualitzar les cèl·lules que presenten senyal fluorescent.

Pel que fa les cèl·lules derivades de la donant 1, la transducció amb *Ttag-GFP* es va realitzar a PD 22 i pocs dies després es va transduir el cultiu amb *hTERT-mChFP* (PD 26). Per obtenir el cultiu amb les tres alteracions, es va fer la transducció amb *HRAS-puromicina* a PD 38. En el cas de la donant 2, la transducció amb *Ttag-GFP* també es va fer pocs dies després de superar l'estasi (PD 11), la transducció amb *hTERT-mChFP* es va fer a PD 21 i finalment es va transduir amb *HRAS-puromicina* a PD 82 (**Figura 45A**). Per tal de seleccionar les cèl·lules que havien estat correctament infectades es van recuperar les que presentaven fluorescència tant per GFP com

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

per mCherry mitjançant citometria de flux (*cell sorting*). En els cultius transduïts amb *HRAS* es va afegir puromicina al medi de cultiu per seleccionar les cèl·lules resistents.

Les cèl·lules transduïdes amb els tres elements gènics van presentar un increment significatiu en l'activitat proliferativa (Figura 46). Això es va traduir en la reducció del temps de duplicació ja que, mentre les cèl·lules no transduïdes van requerir de mitjana 1,8 dies per duplicar el nombre de cèl·lules presents en el cultiu, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van fer-ho amb tan sols 1 dia.

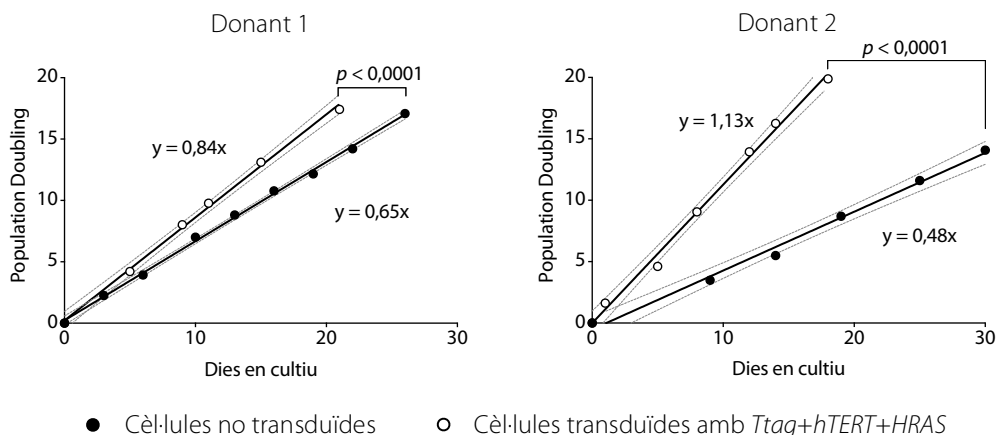


Figura 46. Creixement de les cèl·lules no infectades i transduïdes amb *Ttag+hTERT+HRAS* provinents de la donant 1 i la donant 2. En tots dos casos la transducció amb els tres elements gènics va comportar un increment de la proliferació estadísticament significatiu que va traduir en un pendent de la recta més acusat (anàlisi de regressió lineal amb l'estadístic F).

Caracterització dels diferents cultius cel·lulars

Per tal de conèixer les característiques que presenten els diferents cultius es va analitzar l'expressió dels gens transduïts, la presència d'anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques al cariotip, els marcadors moleculars específics de cèl·lules luminals i mioepitelials i les respostes d'apoptosi i senescència radioinduídes.

Comprovació de les infeccions amb partícules lentivirals

El disseny de les partícules lentivirals utilitzades garanteix que, com a resultat de la infecció, totes les cèl·lules que expressen el gen de selecció (proteïna fluorescent o resistència a antibiòtic) també han integrat el gen d'interès al seu genoma. Tot i així, a més de seleccionar les cèl·lules que expressaven els gens indicadors, vam comprovar la correcta expressió dels gens d'interès analitzant-ne els nivells d'RNA mitjançant PCR quantitativa.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Les corbes d'amplificació obtingudes van demostrar que els cultius infectats havien incorporat *Ttag* i *hTERT* al genoma i aquests s'expressaven correctament (Figura 47A); en canvi en els cultius no infectats no es va observar expressió d'aquests dos gens. En el cas de *HRAS*, totes les mostres van mostrar expressió, independentment de si havien estat infectades o no. Al tractar-se d'un gen amb expressió endògena, es va calcular l'increment dels nivells d'RNA entre els cultius abans i després de ser infectats (Figura 47B). En el cas de la donant 1, l'expressió de *HRAS* va ser de gairebé tres vegades superior als nivells basals, mentre que en la donant 2 els nivells d'expressió d'aquest gen van augmentar més de 5 vegades.

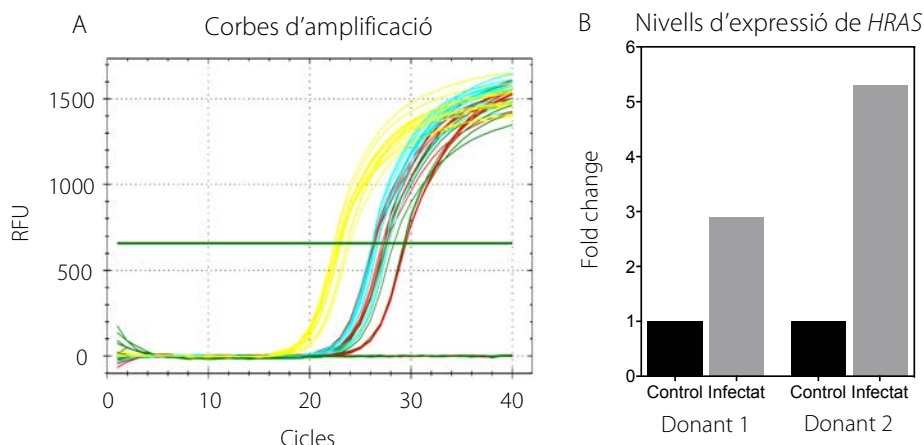


Figura 47. Comprovació dels nivells d'expressió dels gens d'interès. **A.** Corbes d'amplificació dels gens *Ttag* (verd), *hTERT* (vermell), *HRAS* (blau) i *GAPDH* (groc) obtingudes al representar la fluorescència relativa de SYBR (RFU) al llarg dels cicles d'amplificació. Totes les mostres van presentar expressió tant de *GAPDH* com de *HRAS*. Únicament hi va haver amplificació pels gens *Ttag* i *hTERT* en els cultius infectats. **B.** Increment dels nivells de *HRAS* en els cultius infectats respecte als no infectats d'acord amb la fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrita a l'apartat de Material i mètodes titulat "Comprovació de les infeccions".

En conjunt, aquests resultats van demostrar que les cèl·lules infectades amb els diferents vectors lentivirals havien introduït els gens d'interès al seu genoma i que aquests es transcrivien correctament.

Anàlisi citogenètiques

Sovint les cèl·lules cultivades *in vitro* acumulen anomalies cromosòmiques al llarg del cultiu degudes a l'elevat nombre de divisions que realitzen. Tenint en compte que les cèl·lules infectades amb *Ttag* poden presentar reorganitzacions degudes a la inactivació de p53 i pRb, es van obtenir extensions metafàsiques dels diferents cultius que es van hibridar amb sondes telomèriques i centromèriques per valorar la presència d'alteracions estructurals i numèriques (Figura 48).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

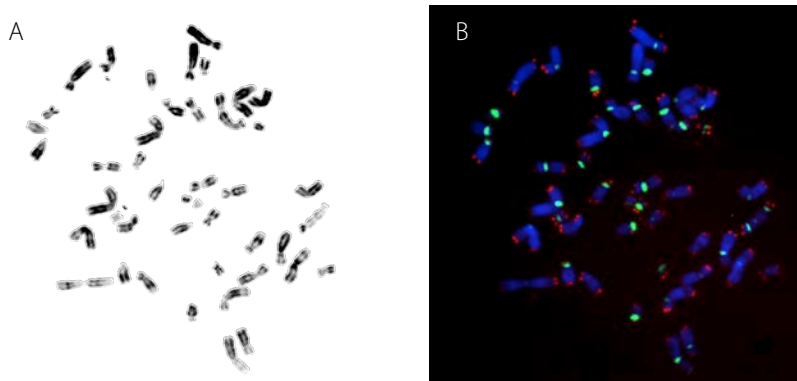


Figura 48. Metafase exemplificativa d'un cultiu de BPECs. A. Captura del patró de bandes DAPI . B. Captura de la corresponent hibridació amb sondes telomèriques (vermell) i centromèriques (verd).

L'anàlisi de les alteracions estructurals i numèriques presents als diferents cultius de BPECs va revelar un augment progressiu de les alteracions a mesura que augmentava el temps en cultiu i s'anaven transduint les cèl·lules amb les construccions *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (**Figura 49**).

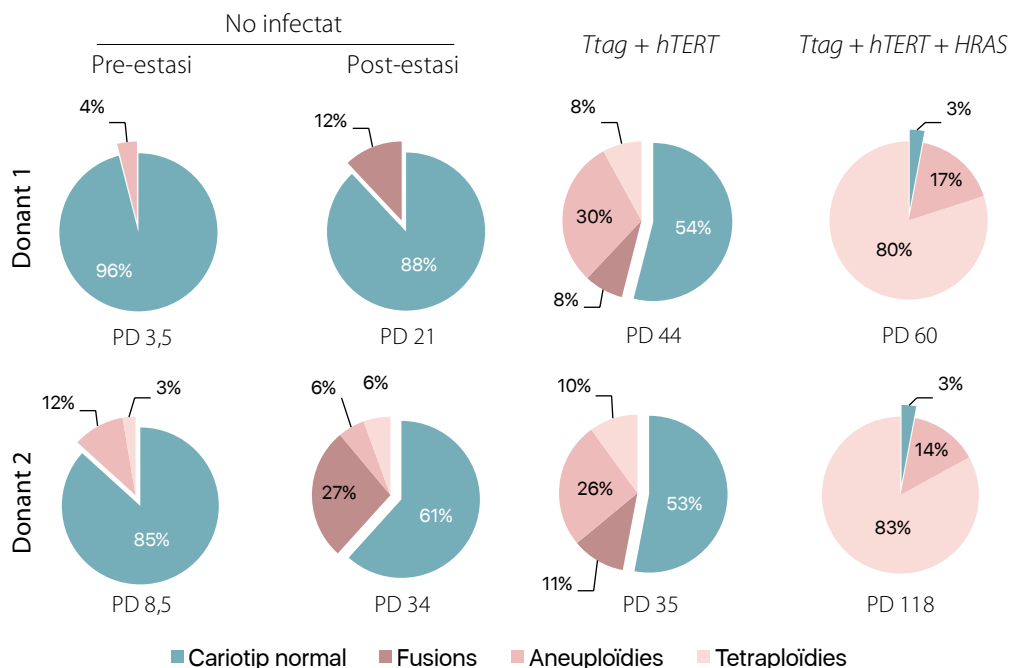


Figura 49. (Figura a la pàgina anterior) Recull de les anàlisis citogenètiques realitzades a les dues donants. S'hi representa el percentatge de cariotips normals i amb alteracions a diferents moments del cultiu de les cèl·lules no transduïdes, transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* provinents de les dues donants.

Recompte de cèl·lules amb característiques mioepiteliales i luminals

Als cultius primaris derivats de teixit mamari hi conviuen cèl·lules de diversos llinatges cel·lulars presents a la glàndula mamària, entre ells s'hi troben les cèl·lules epitelials mamàries luminals i les mioepiteliales. Per tal de identificar la proporció de cèl·lules amb característiques d'un i altre llinatge, es van detectar per immunofluorescència els marcadors claudina 4 i citoqueratina 14, específics de cèl·lules luminals i mioepiteliales respectivament (**Figura 50**).

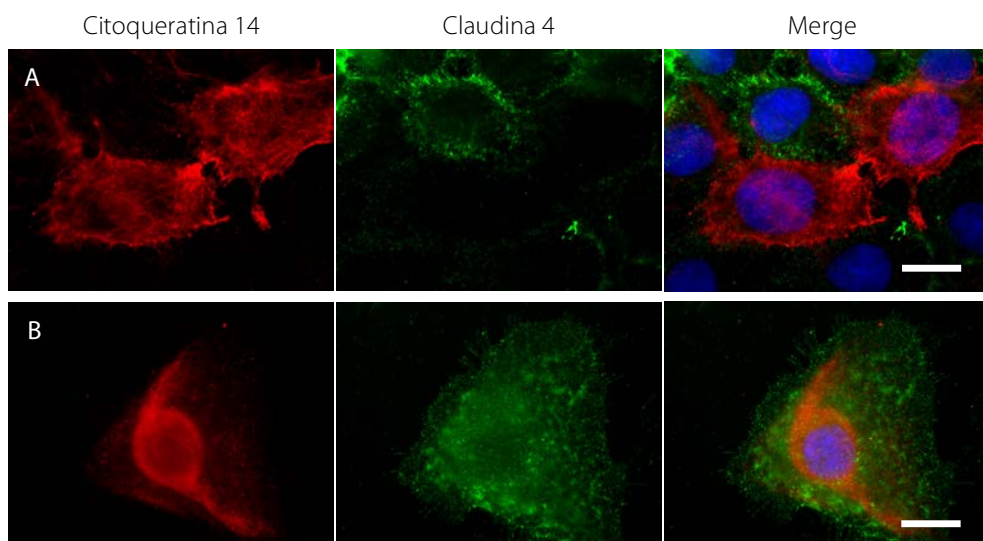


Figura 50. Imatges representativa de les immunofluorescències de citoqueratina 14 (vermell) i claudina 4 (verd) en cèl·lules BPECs (barra d'escala 20 μ m). **A.** Cèl·lules positives per citoqueratina 14 o per claudina 4. **B.** Cèl·lules que presenten marcatge tant per citoqueratina 14 com per claudina 4.

Les cèl·lules valorades es van classificar en tres categories en funció dels marcadors que presentaven: cèl·lules citoqueratina 14 positives, cèl·lules claudina 4 positives i cèl·lules positives pels dos marcadors (**Figura 51**). No es van observar diferències en el percentatge de cèl·lules d'un i altre llinatge ni entre els diferents cultius infectats ni entre les dues donants analitzades. Al voltant d'un 50% de les cèl·lules eren positives per citoqueratina 14, mentre que un 20% de les cèl·lules expressaven claudina 4. Tot i que la majoria de cèl·lules presentaven un o altre marcatge, hi havia un 20% de cèl·lules amb marcatge pels dos llinatges (**Figura 51**). En tots els recomptes el nombre de cèl·lules sense marcatge va ser inferior al 5% de les cèl·lules analitzades. En conjunt aquests resultats indiquen que la proporció de cèl·lules amb característiques luminals i cèl·lules amb característiques mioepiteliales es manté constant.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

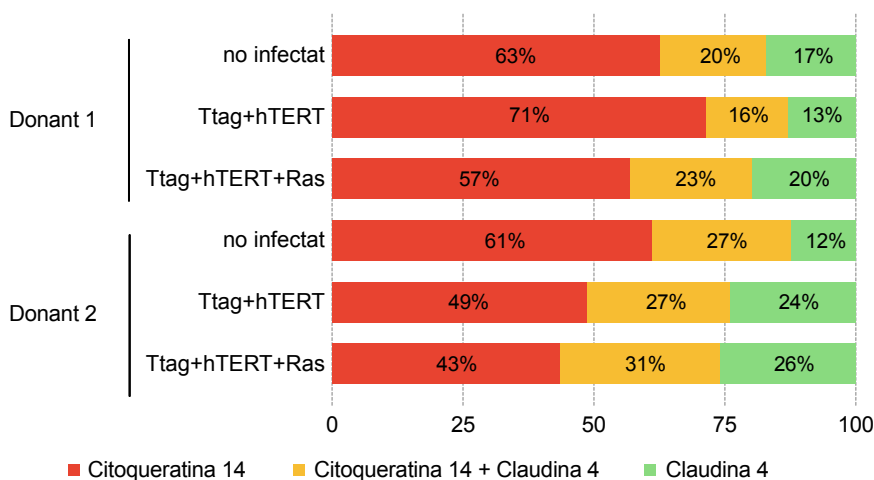


Figura 51. Anàlisi de marcadors específics de cèl·lules luminals i mioepitelials. Percentatge de cèl·lules positives pels marcadors específics de cèl·lules mioepitelials (citoqueratina 14, en vermell), cèl·lules luminals (claudina 4, en verd) i cèl·lules amb doble marcatge (groc) en els diferents cultius. Es van valorar 500 cèl·lules per cadascuna de les mostres analitzades.

Anàlisi d'apoptosi i senescència

Donat que l'interès d'aquesta tesi és veure l'efecte de la radiació en el procés de transformació tumoral es van estudiar els canvis en els nivells d'apoptosi i senescència com a producte de l'exposició a radiació ionitzant. Es van triar aquests processos perquè se sap que les cèl·lules irradiades que no poden reparar el dany, moren per apoptosi o entren en senescència (**Campisi i d'Adda di Fagagna, 2007**). Per fer-ho, es van irradiar cèl·lules pre-estasi i post-estasi a 5 Gy de rajos γ i es va quantificar el nombre de cèl·lules TUNEL positives, indicador de cèl·lules en procés d'apoptosi avançada, i l'activitat de l'enzim β -galactosidasa, actiu en les cèl·lules senescentos.

Es va observar que els nivells basals d'apoptosi es trobaven al voltant de l'1% i que no augmentaven significativament ni 24h ni 48h després de la irradiació (**Figura 52A**). Pel que fa a l'activitat de la β -galactosidasa, el cultiu de BPEC presentava entre un 20% i un 30% de cèl·lules senescentos abans de la irradiació mentre que les cèl·lules irradiades a 5 Gy van presentar entre un 45% i un 60% de cèl·lules senescentos 3 dies post-irradiació, incrementant significativament el nombre de cèl·lules senescentos respecte el cultiu no irradiat (**Figura 52B**).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

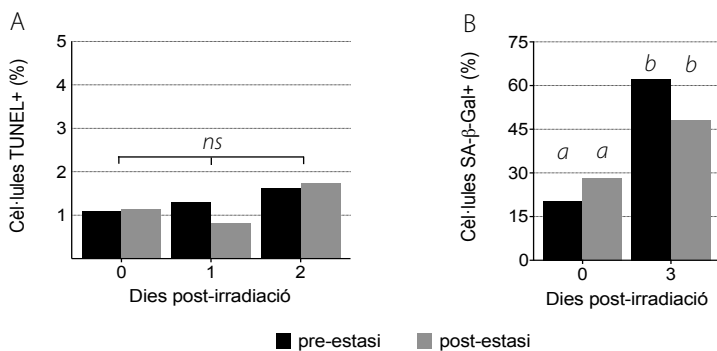


Figura 52. Efecte de la radiació en els nivells d'apoptosi i senescència en cèl·lules pre-estasi i post-estasi. **A.** Nivells d'apoptosi 0, 1 i 2 dies després de la irradiació. **B.** Percentatge de cèl·lules amb activitat β-galactosidasa 0 i 3 dies post-irradiació. Test exacte de Fisher ($p < 0,001$). Diferents lletres indiquen diferències significatives entre els grups; *ns*: no diferències estadísticament significatives.

Aquestes resultats indiquen que, davant un dany massiu induït per radiació ionitzant, les cèl·lules obtingudes a partir del teixit mamari sa entren en un estat de senescència enlloc d'activar el procés de mort cel·lular programada, tant si han superat o no l'estasi.

Test de creixement independent d'ancoratge

Les cèl·lules epitelials mamàries, com la major part dels tipus cel·lulars presents en l'organisme, regulen el seu creixement en funció del contacte amb les cèl·lules veïnes i amb la làmina basal, entre altres factors. Precisament una de les característiques que defineixen les cèl·lules tumorals és la desregulació del seu creixement, fet que les permet sobreviure i inclús proliferar en condicions extremes com l'absència de substrat.

Per tal d'estudiar la capacitat de les BPECs de créixer en absència d'un substrat sobre el què adherir-se, hem utilitzat el test de creixement independent d'ancoratge. Aquesta tècnica consisteix a cultivar les cèl·lules en agar tou, fet que les manté aïllades, immobilitzades i en suspensió evitant la formació d'agrupacions (Figura 53). Únicament aquelles cèl·lules capaces de proliferar en aquestes condicions formen colònies que es poden observar tres setmanes després de ser sembrades.

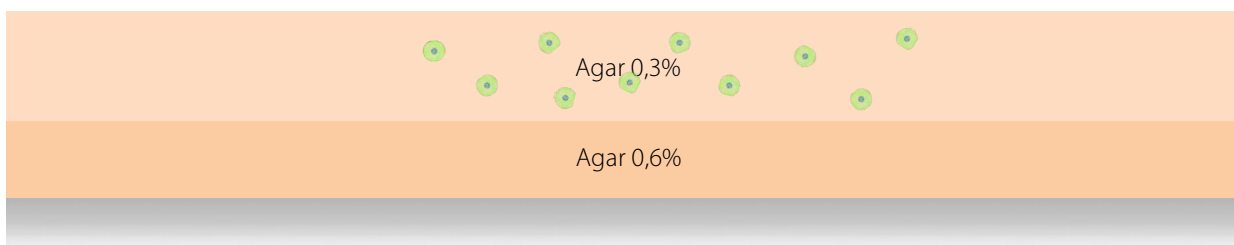


Figura 53. Esquema on es mostra el disseny del cultiu de cèl·lules en independència d'ancoratge.

Creixement en agar del model cel·lular d'experimentació

S'ha demostrat que l'alteració dels nivells d'expressió de *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* en HMECs (*Human Mammary Epithelial Cells*) comporta un augment en el nombre de colònies crescudes en agar tou respecte les cèl·lules control (Elenbaas *et al.*, 2001). Per tal de comprovar que la transducció amb aquests tres elements gènics també comporta la transformació de les BPECs, es va valorar la seva capacitat de créixer amb independència d'ancoratge abans de transduir les cèl·lules i després de transduir-les amb *Ttag* i *hTERT* o *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Per fer-ho, es van sembrar en agar tou 25.000 cèl·lules provinents dels cultius no transduït, transduït amb *Ttag+hTERT* i transduït amb *Ttag+hTERT+HRAS*. Transcorreguts els 21 dies, es va afegir MTT al cultiu durant 24 hores per tal de detectar les colònies formades per cèl·lules vives. L'endemà es van observar les colònies que havien metabolitzat l'MTT formant cristalls de color negre. Visualitzant les plaques de cultiu a ull nu ja es van poder observar diferències evidents en la formació de colònies MTT positives entre els cultius analitzats (**Figura 54**).

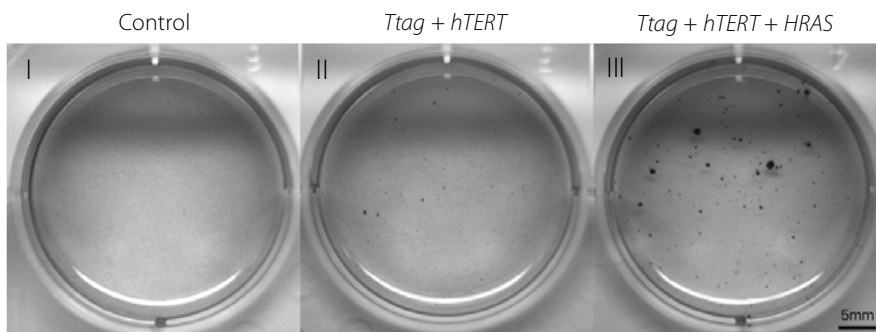


Figura 54. Colònies formades en agar per les cèl·lules no transduïdes (I), transduïdes amb *Ttag+hTERT* (II) i transduïdes amb *Ttag+hTERT+HRAS* (III) després de 21 dies en cultiu. A simple vista es poden observar algunes de les colònies MTT positives.

Es va quantificar el nombre i la mida de colònies mitjançant la captura d'imatges amb un microscopi invertit i l'anàlisi d'aquestes amb el software lliure Fiji (**Figura 55**), seguint el protocol descrit a l'apartat de Material i mètodes titulat "Identificació, recompte i mesura de colònies".

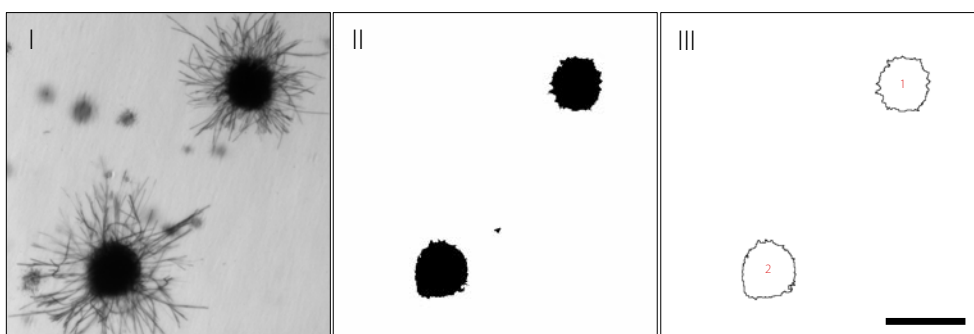


Figura 55. Procés d'anàlisi de les imatges obtingudes de les colònies MTT positives. (I) Imatge representativa de colònies MTT positives capturades amb un microscopi invertit. (II) Imatge binaritzada a partir d'un nivell d'intensitat establert manualment per tal d'eliminar la informació referent a colònies MTT negatives. (III) Identificació automatitzada de les colònies i mesura de l'àrea de cadascuna d'elles de forma individualitzada (barra d'escala: 200 µm).

Gràcies a l'anàlisi semi-automatitzada de les imatges es va obtenir informació de cadascuna de les colònies MTT positives. A partir dels valors d'àrea obtinguts, es va calcular el diàmetre mitjà que presentaven. Per tal de descartar les cèl·lules aïllades que haguessin pogut sobreviure en suspensió però no haguessin proliferat, es van tenir en compte únicament aquelles colònies amb un diàmetre igual o superior a 65 µm. D'acord amb la fórmula descrita a l'apartat de Material i mètodes titulat "Identificació, recompte i mesura de colònies" on es té en compte l'eficiència d'empaquetament, aquest diàmetre correspon a colònies de com a mínim 8 cèl·lules. Els valors obtinguts en dos experiments es van sumar després de descartar les diferències entre rèpliques (Figura 56).

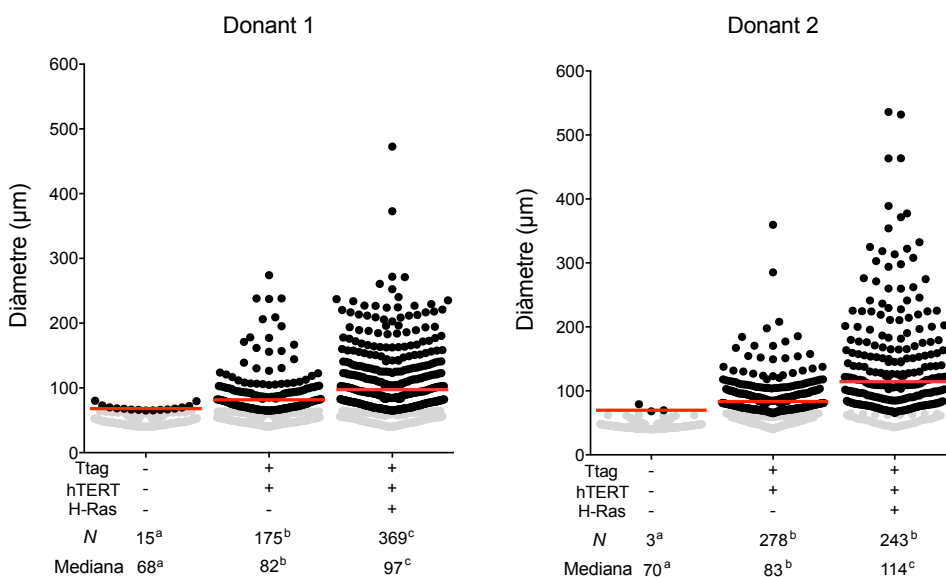


Figura 56. Diagrama de punts de densitat simètrica on s'hi representen les colònies formades en agar tou pels cultius control, *Ttag+hTERT* i *Ttag+hTERT+HRAS* de la donant 1 i la donant 2. Cada punt representa una colònia disposada en l'eix Y en funció de la seva mida. La línia vermella indica la mediana de cada grup. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre mostres de la mateixa donant (*N*: nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

Tal com s'esperava, es va observar una capacitat de créixer amb independència d'ancoratge molt baixa de les cèl·lules **no transduïdes** provinents tant de la donant 1 (d1) com la donant 2 (d2). Poques cèl·lules van ser capaces de sobreviure en suspensió (d1: 15 colònies; d2: 3 colònies), i les que ho van fer van formar colònies petites (~70 µm). Pel que fa als resultats obtinguts en cèl·lules transduïdes amb ***Ttag* i *hTERT*** provinents tant de la donant 1 com la donant 2, es va veure un increment en el nombre de les colònies formades respecte les no transduïdes (d1: 175 colònies; d2: 278 colònies) i un augment en la mida d'aquestes colònies

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

(d1 i d2: ~82 μm). Per últim, les cèl·lules infectades amb **Ttag, hTERT i HRAS** van formar colònies en agar tou encara més grans que les cèl·lules infectades només amb *Ttag* i *hTERT* (d1: 97 μm ; d2: 114 μm). Aquest augment en la mida es va acompanyar d'un increment en el nombre de colònies formades en el cas de les cèl·lules provinents de la donant 1 (369 colònies vs 175 colònies) però, en el cas de les cèl·lules provinents de la donant 2, no es van observar diferències significatives en el nombre de colònies (243 colònies vs 278 colònies).

En resum, la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge de les BPEC es veu incrementada a mesura que augmenta el nombre d'alteracions gèniques introduïdes. Entenent el test de creixement independent d'ancoratge com una eina per valorar una de les característiques de les cèl·lules tumorals, es pot concloure que l'alteració de *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* en BPECs condueix a la seva transformació. Tanmateix, l'alteració de *Ttag* i *hTERT*, tot i conferir un increment de la mida i del nombre de colònies formades respecte les cèl·lules no transduïdes, no comporta un augment en el creixement independent d'ancoratge tan elevat com en el cas de les cèl·lules amb els tres elements genètics alterats. Per tant, l'alteració de *Ttag* i *hTERT* va comportar graus intermedis de capacitat de creixement amb independència d'ancoratge.

Creixement en agar de les cèl·lules irradiades

La radiació ionitzant és un agent causant de dany al DNA que pot donar lloc a alteracions genètiques inductores de la transformació oncogènica. Per poder determinar si la radiació pot conduir a la transformació de les BPECs, es van irradiar cèl·lules no transduïdes de les donants 1 i 2 amb 1 i 2 Gy de raigs γ per posteriorment valorar la seva capacitat de créixer en independència d'ancoratge. Paral·lelament també es va analitzar la capacitat de créixer en suspensió de les BPECs parcialment transformades (transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*) després d'irradiar-les per tal de veure si el dany radioinduit altera el creixement en suspensió de cèl·lules en procés de transformació de manera diferent a les BPECs no transduïdes.

Degut a que els efectes carcinogènics derivats de l'exposició a radiació ionitzant requereixen temps per manifestar-se (Calaf i Hei, 2000; Vogelstein *et al.*, 2013), es va decidir estudiar la capacitat dels diferents cultius irradiats de créixer en suspensió passades 4 i 8 setmanes després de la irradiació. Per descartar la transformació espontània adquirida durant el cultiu, el test de creixement independent d'ancoratge també es va aplicar a cultius homòlegs no irradiats i

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

mantinguts el mateix temps en cultiu. A més a més, al llarg de les 8 setmanes post-irradiació es va analitzar la taxa de proliferació dels cultius irradiats a 1 Gy i 2 Gy, així com del seu control no irradiat, per tal de comprovar que durant aquest període en cultiu no hi va haver cap aturada en el creixement de les cèl·lules que pogués influir en la formació de colònies en agar tou.

Cèl·lules no transduïdes

Pel que fa a les cèl·lules no transduïdes derivades de la **donant 1** es va observar una lleugera disminució inicial en la taxa de proliferació dels cultius irradiats respecte el cultiu no irradiat (**Figura 57**). Tot i aquest petit desfàs inicial, durant les següents setmanes tant les cèl·lules irradiades com les no irradiades van presentar la mateixa taxa proliferativa.

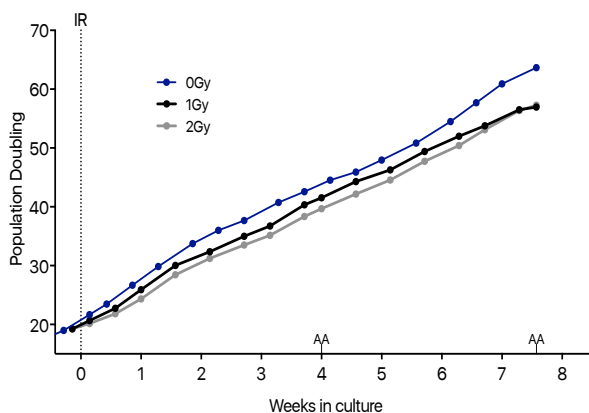


Figura 57. Creixement de les cèl·lules derivades de la donant 1 al llarg de les 8 setmanes posteriors a la irradiació. La línia puntejada indica el moment en què es van irradiar els cultius amb 1 Gy o 2 Gy de radiació γ . A l'eix X s'indica el moment en què es va realitzar el test de creixement independent d'ancoratge.

L'anàlisi de les colònies formades en agar no va revelar cap canvi significatiu ni en el nombre ni en la mida de les colònies de les cèl·lules irradiades a 1 i 2 Gy mantingudes en cultiu durant 4 setmanes, respecte la mida de les colònies formades per les cèl·lules no irradiades (**Figura 58A**). En canvi, a les 8 setmanes post-irradiació es va observar un augment en la capacitat de créixer en suspensió de les cèl·lules exposades a 2 Gy respecte les no irradiades evidenciat per la formació de més colònies i de major diàmetre (**Figura 58B**). El fet que les cèl·lules irradiades a 1 Gy no presentessin diferències respecte les cèl·lules no irradiades a les 8 setmanes post-irradiació podria ser degut a que el dany induït amb aquesta dosi fos assumible per les BPECs, que serien capaces de reparar el dany generat per 1 Gy de radiació ionitzant sense modificar la capacitat de créixer independentment d'ancoratge. En canvi, les cèl·lules irradiades a 2 Gy no podrien reparar correctament el dany generat, fet que comprometria la integritat genòmica i comportaria canvis,

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

com a mínim en la capacitat d'aquestes cèl·lules de créixer amb independència d'ancoratge en el termini de només 8 setmanes.

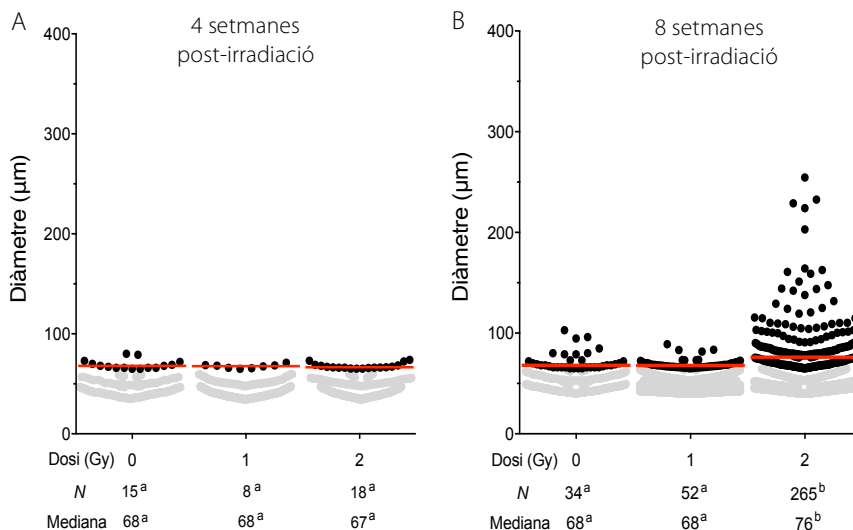


Figura 58. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 1 irradiades a 1 Gy i 2 Gy de radiació i juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 µm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (N: nombre de colònies, test exacte de Fisher, p<0,05; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, p<0,05).

En el cas de les cèl·lules provinents de la **donant 2**, la cinètica de creixement durant les 4 primeres setmanes es va mantenir pràcticament idèntica tant pels cultius irradiats amb 1 i 2 Gy i el cultiu no irradiat. Durant les últimes setmanes es va observar una disminució de la taxa de proliferació de les cèl·lules irradiades a 1 Gy (Figura 59).

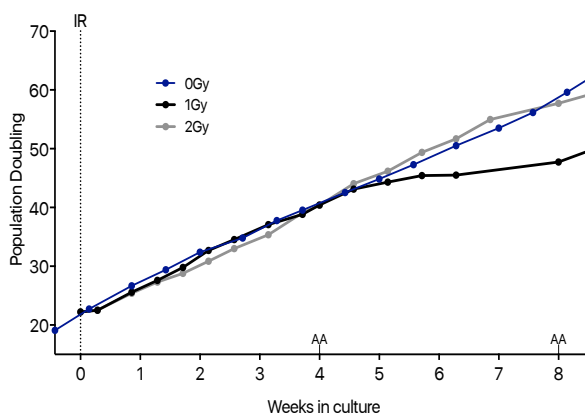


Figura 59. Creixement de les cèl·lules derivades de la donant 2 al llarg de les 8 setmanes posteriors a la irradiació. La línia puntejada indica el moment en què es van irradiar els cultius amb 1 Gy o 2 Gy de radiació γ . A l'eix X s'indica el moment en què es va realitzar el test de creixement independent d'ancoratge.

Els resultats obtinguts amb el test de creixement independent d'ancoratge, tot i les petites diferències en el nombre de colònies formades, indiquen que l'exposició a 1 o 2 Gy de radiació γ no provoca canvis de la mida de les colònies formades en agar tou ni 4 (**Figura 60A**) ni 8 setmanes post-irradiació (**Figura 60B**).

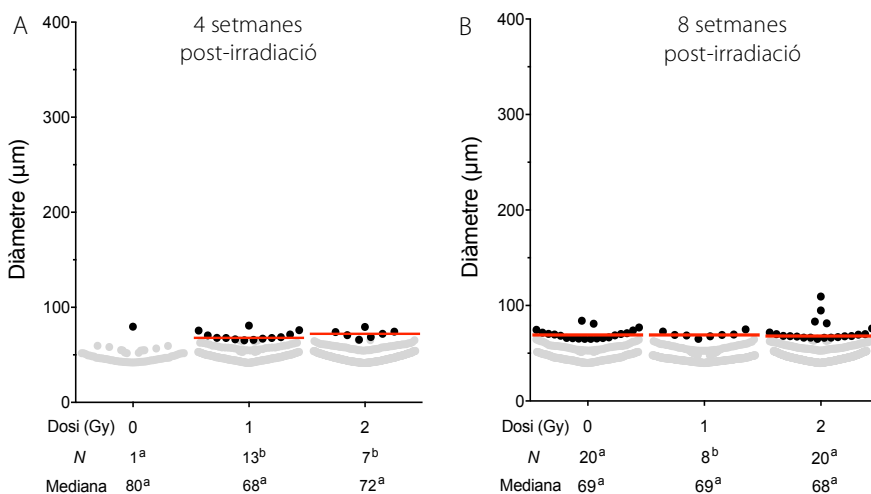


Figura 60. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 2 irradiades a 1 i 2 Gy de rajos γ juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 μm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (N : nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

El fet de no observar cap efecte de l'exposició a 1 i 2 Gy sobre el creixement amb independència d'ancoratge podria ser degut a que la dosi fos excessiva per a les cèl·lules d'aquesta donant i no haguessin pogut reparar el danyat radioinduit; o bé que la dosi a la que es van exposar les cèl·lules fos insuficient per generar reorganitzacions capaces de modificar la capacitat de créixer independentment d'ancoratge. Donat que l'interès de l'estudi era veure el nivell mínim de radiació en que les cèl·lules assolien característiques tumorals, es va decidir irradiar a dosis inferiors a 1 Gy per distingir entre les dues possibilitats. Concretament, es van exposar les cèl·lules provinents de la donant 2 a 0,25 Gy i 0,5 Gy i es va testar la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge 4 i 8 setmanes post-irradiació.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Els resultats obtinguts mostren que cap de les dues dosis (0,25 Gy i 0,5 Gy) va ser suficient per provocar un canvi en el nombre o la mida de les colònies formades respecte les cèl·lules no irradiades ni a 4 (Figura 61A) ni a 8 setmanes post-irradiació (Figura 61B). Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules provinents de la donant 2 són més resistents a la radiació ionitzant en comparació a les de la donant 1 ja que molt probablement requereixen dosis més elevades (>2 Gy) per manifestar efectes de la radiació en termes de creixement independent d'ancoratge.

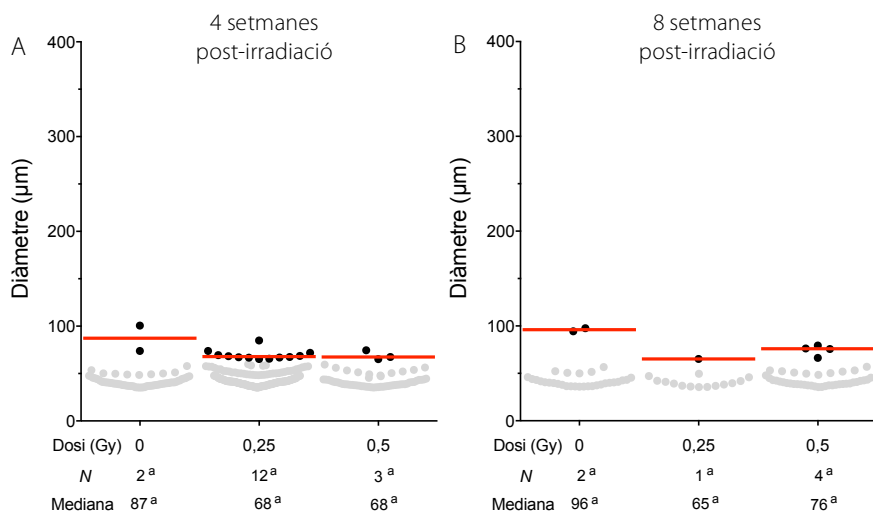


Figura 61. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 2 irradiades a 0,25 Gy i 0,5 Gy de radiació y juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 µm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (N: nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

En resum, tenint en compte els resultats obtinguts en les dues donants, podem concloure que les BPECS requereixen dosis de com a mínim 2 Gy i 8 setmanes en cultiu post-irradiació per manifestar canvis en la capacitat de créixer en suspensió.

Cèl·lules transduïdes amb Ttag i hTERT

Pel que fa a les cèl·lules transduïdes amb Ttag i hTERT, en el cas de la **donant 1**, les corbes de creixement no van mostrar cap diferència entre els cultius irradiats i el no irradiat (Figura 62).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

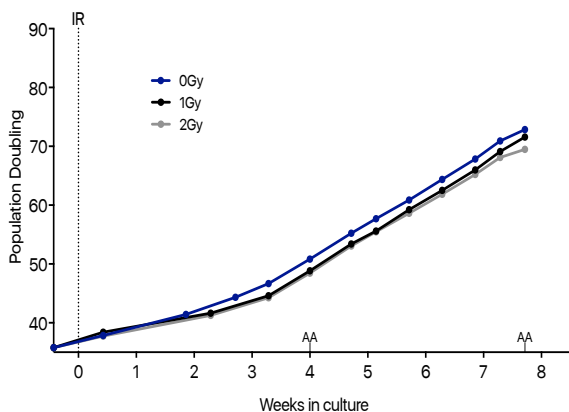


Figura 62. Creixement de les cèl·lules derivades de la donant 1 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* al llarg de les 8 setmanes posteriors a la irradiació. La línia puntejada indica el moment en què es van irradiar els cultius amb 1 Gy o 2 Gy de radiació γ . A l'eix X s'indica el moment en què es va realitzar el test de creixement independent d'ancoratge.

L'anàlisi de les colònies formades en agar tou va demostrar que, tot i la lleugera variació en el nombre de les colònies formades, no hi havia diferències en la mida de les colònies formades 4 setmanes post-irradiació (**Figura 63A**). En canvi, 8 setmanes després d'haver-les exposat a 1 Gy de raigs γ , es va veure un augment de la mida i el nombre de les colònies respecte a les colònies formades per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* no irradiades (**Figura 63B**).

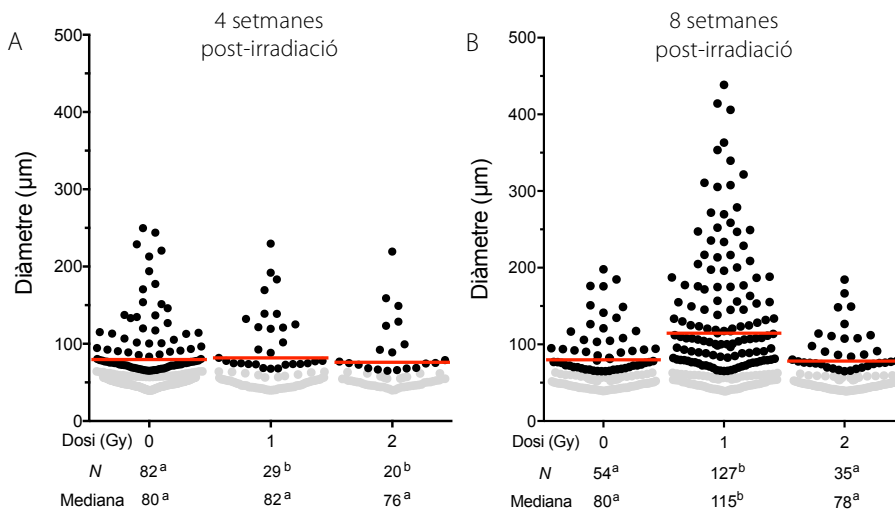


Figura 63. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 1 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i irradiades a 1 Gy i 2 Gy de radiació γ juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 μm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (N: nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

El fet que a les 8 setmanes post-irradiació no s'observessin canvis entre les colònies formades per cèl·lules irradiades a 2 Gy i les formades per cèl·lules no irradiades podria ser degut a que el dany radioinduit fos massa elevat per unes cèl·lules amb p53 i pRb inactives. La manca d'aquestes dues proteïnes impediria el correcte funcionament dels punts de control del cicle cel·lular, fet que comportaria una acumulació del dany no reparat impeding el correcte funcionament de la cèl·lula. Per tant, dins el mateix cultiu, les cèl·lules que haurien rebut menys dany l'haurien reparat correctament però les que n'haurien acumulat més haurien mort després de la irradiació.

És important destacar que, mentre que les cèl·lules no transduïdes provinents de la donant 1 van requerir 2 Gy per augmentar significativament el nombre i la mida de les colònies formades en agar, les cèl·lules de la mateixa donant transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* només van necessitar la meitat de la dosi (1 Gy) per mostrar un augment respecte el no irradiat. Aquest fet suggereix un increment en la susceptibilitat de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* davant la radiació que les faria més propenses a adquirir característiques de cèl·lules tumorals. Per tal de valorar l'abast d'aquesta susceptibilitat es va irradiar les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* provinents de la donant 1 amb dosis inferiors a 1 Gy. Concretament, es van irradiar les cèl·lules provinents de la donant 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* amb 0,25 Gy i 0,5 Gy i es va testar la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge 4 i 8 setmanes post-irradiació.

Sorprenentment a les 4 setmanes després de l'exposició a radiació es va observar un augment en el nombre i la mida de les colònies formades a partir de cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i irradiades a 0,25 i 0,5 Gy (**Figura 64A**). Pel que fa als resultats de les 8 setmanes post-irradiació, en comparació als resultats obtinguts en cultius similars, es va observar una disminució global de la mida de les colònies en tots els grups analitzats, inclòs el control no irradiat. Aquesta variació podria ser deguda a canvis incontrolables de la densitat o de la temperatura de l'agar que afectessin la formació de les colònies. Per aquest motiu no es va aplicar el límit de 65 µm de diàmetre per dur a terme l'anàlisi dels resultats. Tot i la disminució global de la mida de les colònies, es va poder observar que les cèl·lules irradiades amb 0,5 Gy van formar més colònies i de major diàmetre en comparació a les formades per les cèl·lules irradiades a 0,25 Gy i les no irradiades (**Figura 64B**). Això posa de manifest la importància d'incorporar el control no irradiat en el mateix experiment per poder identificar variacions que afecten a tots els cultius i poder distingir aquelles diferències en el creixement independent d'ancoratge degudes a la exposició a radiació ionitzant.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

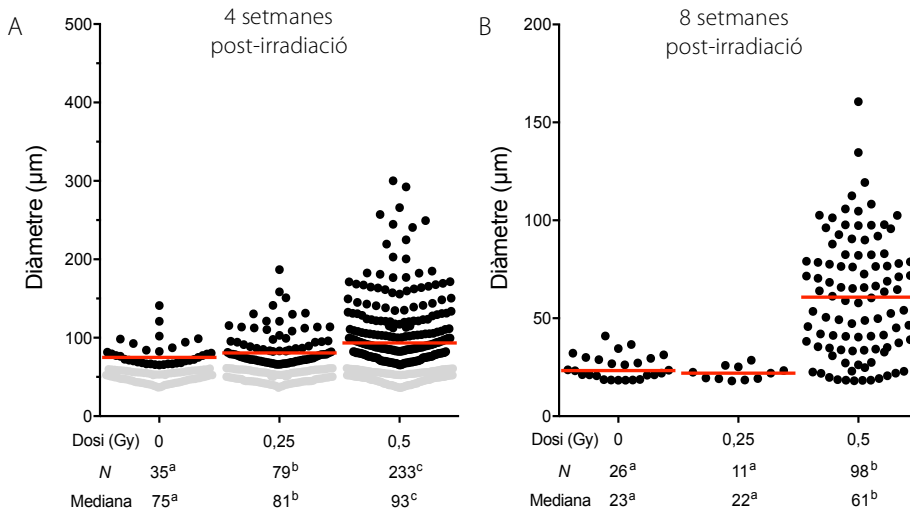


Figura 64. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 1 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i irradiades a 0,25 Gy i 0,5 Gy de radiació γ juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 µm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (*N*: nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

Pel que fa a les cèl·lules de la **donant 2** transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, tot i el lleuger retard en el creixement durant les primeres setmanes d'acord amb la dosi de radiació rebuda, van presentar una cinètica de creixement molt similar tant en els cultius irradiats com en el cultiu no irradiat.

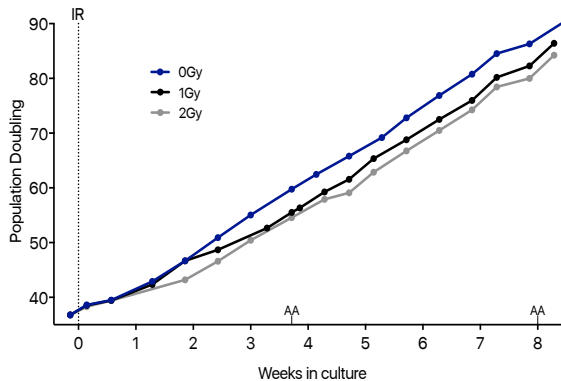


Figura 65. Creixement de les cèl·lules derivades de la donant 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* al llarg de les 8 setmanes posteriors a la irradiació. La línia puntejada indica el moment en què es van irradiar els cultius amb 1 Gy o 2 Gy de radiació γ . A l'eix X s'indica el moment en què es va realitzar el test de creixement independent d'ancoratge.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

El test de creixement independent d'ancoratge va mostrar, un augment en el nombre i la mida de les colònies formades a partir de les cèl·lules irradiades a 2 Gy respecte les no irradiades a les 4 setmanes post-irradiació. (Figura 66A). A les 8 setmanes post-irradiació, com en el cas de la donant 1, les colònies formades van ser en general més petites respecte les obtingudes en cultius similars. Per aquest motiu, per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de la donant 2 tampoc es va aplicar el lindar de 65 µm de diàmetre i es van analitzar la totalitat de les colònies formades. Tenint en compte aquesta premissa, els resultats van mostrar un augment significatiu del diàmetre mitjà de les colònies formades a partir de cèl·lules irradiades a 2Gy respecte les colònies provinents de cèl·lules no irradiades tot i que no es va correspondre amb un increment del nombre de colònies formades (Figura 66B)

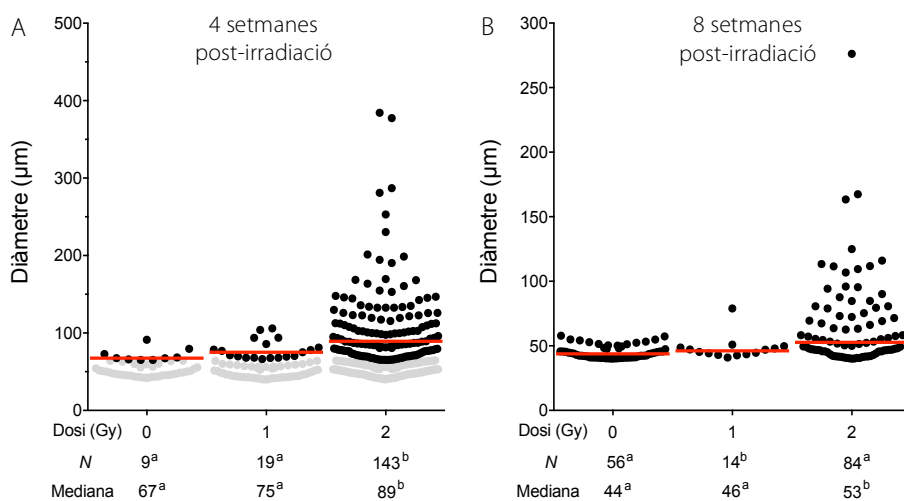


Figura 66. Colònies formades en agar per les cèl·lules derivades de la donant 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i irradiades a 1 Gy i 2 Gy de radiació γ juntament amb el control no irradiat al cap de 4 (A) i 8 setmanes post-irradiació (B). La línia vermella indica la mediana de cada grup. A la part inferior del gràfic s'indica el nombre de colònies amb un diàmetre superior a 65 µm i la mediana de la mida d'aquestes. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres del mateix temps post-irradiació (N: nombre de colònies, test exacte de Fisher, $p < 0,05$; Mediana, test de Kruskal-Wallis amb correcció per múltiples comparacions, $p < 0,05$).

Així doncs, en el cas de les cèl·lules derivades de la donant 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, una dosi de 2 Gy i un temps de 4 setmanes post-irradiació van ser suficients per produir un augment en la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge en comparació a les cèl·lules no irradiades. Això indica un augment de la susceptibilitat a la radiació ionitzant a causa de la transducció amb *Ttag* i *hTERT*, ja que les mateixes cèl·lules sense transduir no van mostrar indicis de transformació ni tant sols 8 setmanes després d'irradiar-les a 2 Gy.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Tot i les diferències entre les dues donants, es manté una tendència a adquirir la capacitat de créixer en suspensió amb menor dosi de radiació quan les cèl·lules es troben parcialment transformades.

Creixement independent d'ancoratge de cèl·lules no transduïdes vs transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*

Tenint en compte els resultats de les dues donants, es pot concloure que la radiació ionitzant és capaç de causar un increment en la capacitat de créixer en suspensió de les cèl·lules epitelials mamàries humanes. D'altra banda, aquelles cèl·lules parcialment transformades (transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*) requereixen menors dosis de radiació per incrementar la seva capacitat de créixer amb independència d'ancoratge.

Concretament, les cèl·lules derivades de la donant 1 requereixen dosis de 2 Gy per mostrar canvis en la seva capacitat de créixer amb independència d'ancoratge en comparació amb les cèl·lules no irradiades, mentre que quan estan transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* n'hi ha prou irradiant-les amb 0,5 Gy (Figura 67).

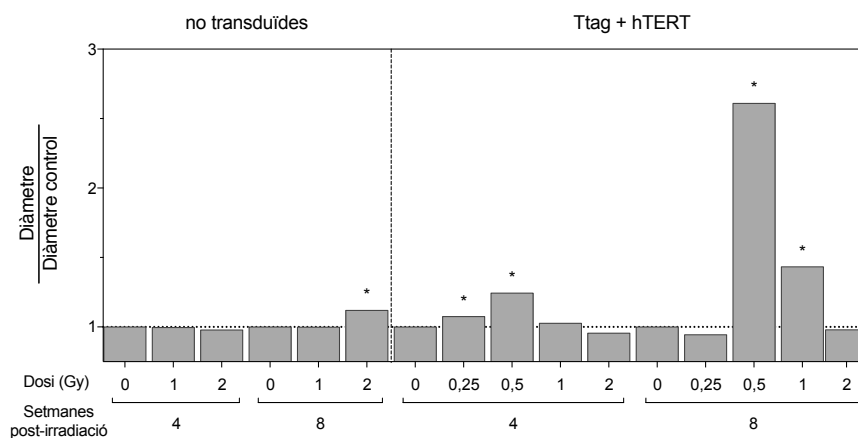


Figura 67. Recull dels resultats obtinguts en el test de creixement independent d'ancoratge en les cèl·lules no transduïdes i transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* provinents de la donant 1. Es representa la mediana del diàmetre de cada cultiu dividit pel valor del seu control no irradiat. Els asteriscs (*) indiquen els cultius que presenten diferències significatives en la mida de les colònies formades respecte el seu control no irradiat.

En referència a les cèl·lules no transduïdes derivades de la donant 2, probablement requereixen dosis més elevades de radiació (>2 Gy) per manifestar algun efecte en el creixement independent d'ancoratge, mentre que les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* mostren un augment en la capacitat de créixer en suspensió quan s'irradien amb 2 Gy (Figura 68).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

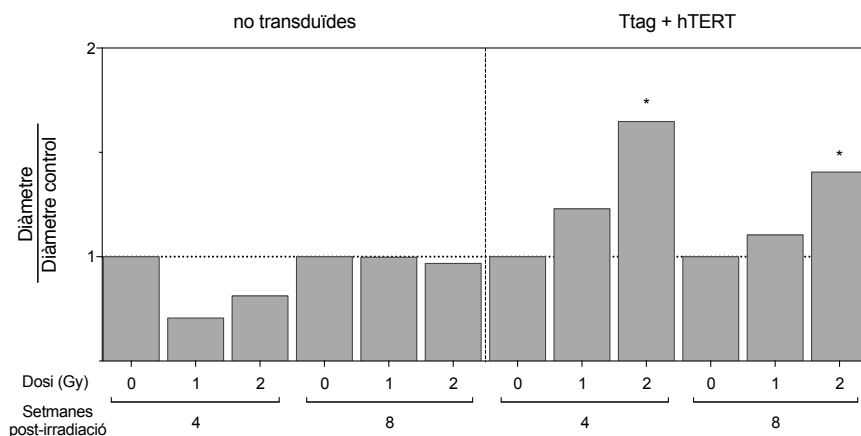


Figura 68. Recull dels resultats obtinguts en el test de creixement independent d'ancoratge en les cèl·lules no transduïdes i transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* provinents de la donant 2. Els asteriscs (*) indiquen els cultius que presenten diferències significatives en la mida de les colònies formades respecte el seu control no irradiat.

Les diferències observades a nivell interindividual indiquen que hi ha certa heterogeneïtat en la resposta davant la radiació ionitzant. Tot i els diferents graus de sensibilitat basal, els resultats obtinguts per les dues donants segueixen la mateixa tendència: requerir menys dosi de radiació per adquirir la capacitat de créixer en suspensió quan són transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*.

Cultiu tridimensional en Matrigel

El cultiu convencional de cèl·lules adherides sobre superfícies és un mètode còmode i assequible per mantenir i expandir multitud de tipus cel·lulars. Tot i així, el creixement cel·lular en monocapa difereix molt de les condicions en que es troben les cèl·lules quan formen part d'un organisme. El cultiu en Matrigel permet a les cèl·lules adoptar una disposició tridimensional gràcies a la matriu extracel·lular rica en laminina i col·lagen que les manté en unes condicions de cultiu més properes a les fisiològiques (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 1992; Weigelt i Bissell, 2008).

Per tal d'estudiar la capacitat de les BPECs de formar estructures organitzades en cultius tridimensionals, les cèl·lules es van sembrar sobre una capa de Matrigel envoltades de medi de cultiu suplementat amb un 4% de Matrigel (Figura 53).

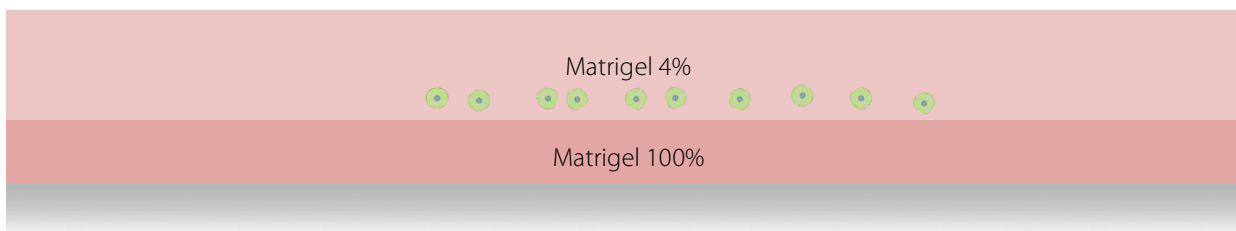


Figura 69. Esquema on es mostra el disseny del cultiu tridimensional de cèl·lules en Matrigel.

Formació dels acini

Les cèl·lules epitelials mamàries mantingudes en cultius tridimensionals en Matrigel s'organitzen formant estructures esfèriques anomenades *acini*, donada la gran similitud amb les estructures amb el mateix nom presents a la glàndula mamària.

Es va estudiar la formació dels acini durant les primeres hores en cultiu per tal d'obtenir informació sobre com es donava aquest procés inicial. El dia després d'haver sembrat les cèl·lules en Matrigel es va observar l'aparició d'agrupacions de cèl·lules formant estructures similars als acini. Per tal de distingir si les estructures s'havien format a partir de la divisió d'una única cèl·lula o per agrupació de cèl·lules veïnes es va estudiar el procés de formació dels acini amb detall realitzant captures del cultiu cada 10 minuts (time-lapse) durant les 15 primeres hores de cultiu (Figura 70).

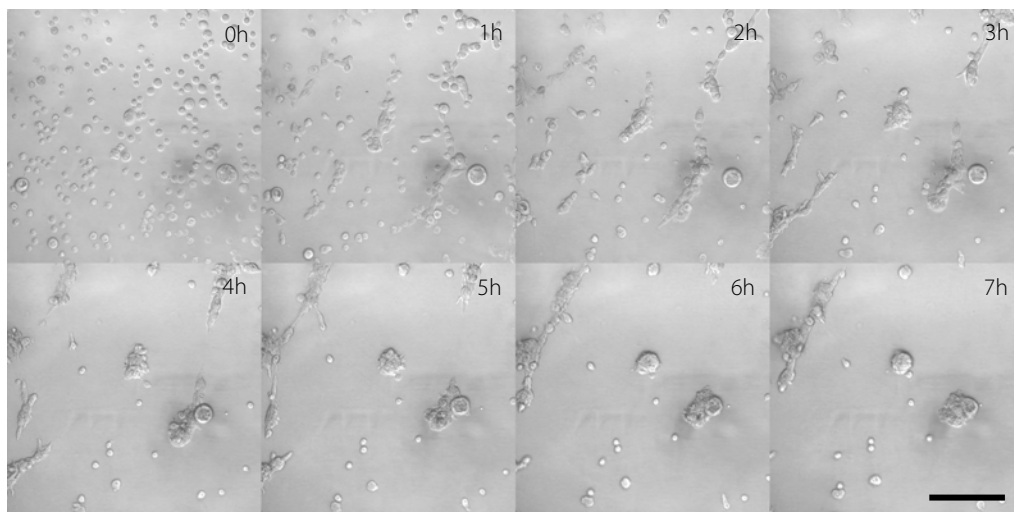


Figura 70. Imatges representatives de les set primeres hores del *time-lapse* després de sembrar BPECs en cultiu tridimensional en Matrigel (barra d'escala 100 μ m).

El seguiment continuat amb *time-lapse* va mostrar que les BPECs en Matrigel es mouen lliurement agrupant-se amb les cèl·lules veïnes per organitzar estructures similars als acini durant les 6-7 primeres hores en cultiu. Transcorregut aquest temps la principal agregació de cèl·lules per formar acini es va aturar i la mida dels acini va començar a augmentar gràcies a la proliferació de les cèl·lules que els formen.

Un cop determinat l'origen de les estructures formades en Matrigel, es va controlar el seu creixement al llarg dels dies posteriors. Per fer-ho es va mesurar el diàmetre dels acini al cap de 1, 7 i 14 dies d'haver sembrat les cèl·lules en Matrigel.

La mida dels acini formats 24 hores després d'haver sembrat les cèl·lules presentava certa variabilitat entre els acini d'un mateix cultiu (**Figura 70**). També es van observar diferències en la mida de les estructures formades per diferents cultius. Tanmateix, aquestes diferències no es van veure relacionades amb les alteracions gèniques o la dosi de radiació rebuda indicant una possible aleatorietat o causa desconeguda. Per aquest motiu, es va decidir que la valoració del creixement dels acini es faria estudiant l'increment respecte el dia 1 del diàmetre mitjà dels acini als diferents temps analitzats.

En resum, els acini formats per les BPECs es van originar a partir de l'agrupació de cèl·lules durant les primeres hores en cultiu. Aquest procés d'agregació va ser una font de variabilitat que va

donar lloc a agrupacions acinars de diferent mida durant les primeres 24 hores i que va determinar la mida dels acini dels posteriors dies en cultiu.

Creixement en cultiu tridimensional del model cel·lular d'experimentació

S'ha descrit que les estructures formades en cultius tridimensionals en Matrigel poden variar en funció del perfil d'expressió gènica (Kenny *et al.*, 2007). Per tal de valorar les estructures tridimensionals formades per les diferents mostres que conformen el model experimental de transformació, es van cultivar en Matrigel les cèl·lules no transduïdes, les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i les transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*.

Amb la intenció de valorar el creixement dels acini independentment de les diferències que s'observen en el procés d'agregació inicial, es va calcular l'increment en la mida dels acini al llarg del temps (7 i 24 dies després de posar-les en cultiu en Matrigel) respecte la que tenien el primer dia, quan ja s'havien format la major part d'agrupacions.

Els resultats no van mostrar cap relació entre les variacions en el creixement dels acini en funció de si les cèl·lules d'origen eren no transduïdes (N), doblement transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* (D), o triplement transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (T). Mentre que per la donant 1 els acini amb un major creixement van ser els formats per les cèl·lules no transduïdes, en el cas de la donant 2 els acini formats per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van ser els que van mostrar un creixement més elevat (Figura 71).

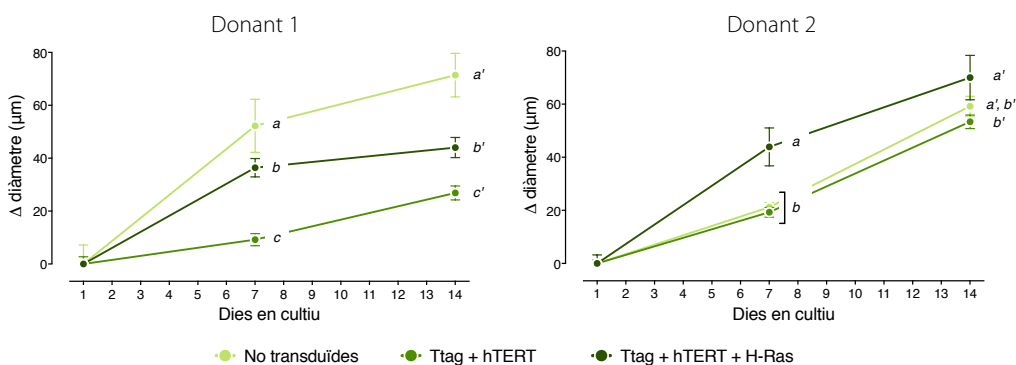


Figura 71. Increment del diàmetre dels acini formats per cèl·lules provinents de la donant 1 i la donant 2 al llarg del temps en cultiu. Cada punt representa la mitjana del diàmetre i l'error estàndard per cada mostra i temps. Diferents lletres indiquen diferències estadísticament significatives entre el diàmetre dels acini a un temps en cultiu determinat (7 o 14 dies) i per donant (ANOVA de dues vies amb correcció de Tukey per a múltiples comparacions; p<0,05).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Transcorreguts 14 dies en cultiu es va contar el **nombre d'acini formats** per les diferents mostres. Els resultats obtinguts van mostrar que les cèl·lules provinents de la donant 1 transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van formar el doble d'acini que els formats per les transduïdes únicament amb *Ttag* i *hTERT* o les no transduïdes. En el cas de la donant 2, van ser les cèl·lules no transduïdes les que van formar un major nombre d'acini. Les cèl·lules transduïdes tant amb *Ttag* i *hTERT* o *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van formar molts menys acini en comparació amb els formats per les cèl·lules no transduïdes (Figura 72).

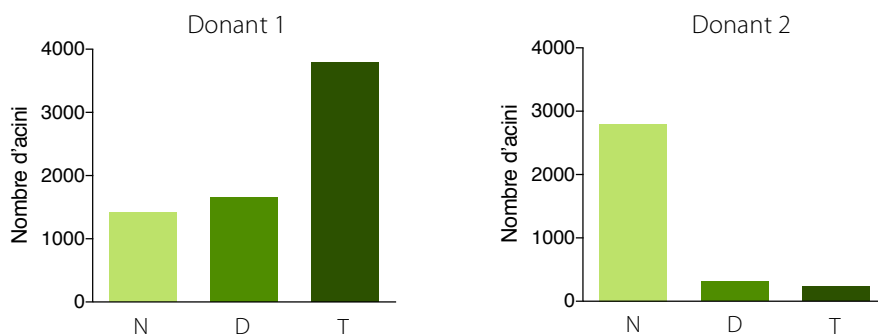


Figura 72. Nombre d'acini formats per les cèl·lules provinents de la donant 1 i la donant 2 no transduïdes (N), transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* (D) i transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (T). Diferents lletres indiquen diferències estadísticament significatives entre el nombre d'acini formats entre les cèl·lules provinents de la mateixa donant.

En conjunt, els resultats obtinguts per les cèl·lules que conformen el model cel·lular de transformació experimental suggereixen que no hi ha una tendència clara entre la transducció amb els elements *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* i la mida o el nombre dels acini formats.

Creixement en cultiu tridimensional de les mostres irradiades

Tot i haver observat que el nombre d'acini o la mida d'aquests no es veuen afectats de forma clara per la transducció amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*, es va valorar si l'exposició a radiació ionitzant afectava el creixement dels cultius tridimensionals en Matrigel. Per fer-ho es van irradiar els cultius de cèl·lules no transduïdes i transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* amb 0,5, 1 i 2 Gy de raigs gamma i es van sembrar en cultius tridimensionals en Matrigel a les 8 setmanes post-irradiació.

Els resultats obtinguts en referència al **creixement dels acini** van indicar que, tot i algunes diferències entre les dues donants, els acini formats per les cèl·lules no transduïdes creixen menys després d'exposar-les a radiació ionitzant (Figura 73A). Per contra, els acini formats per

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* irradiades tendeixen a créixer igual o més que les no irradiades (Figura 73B).

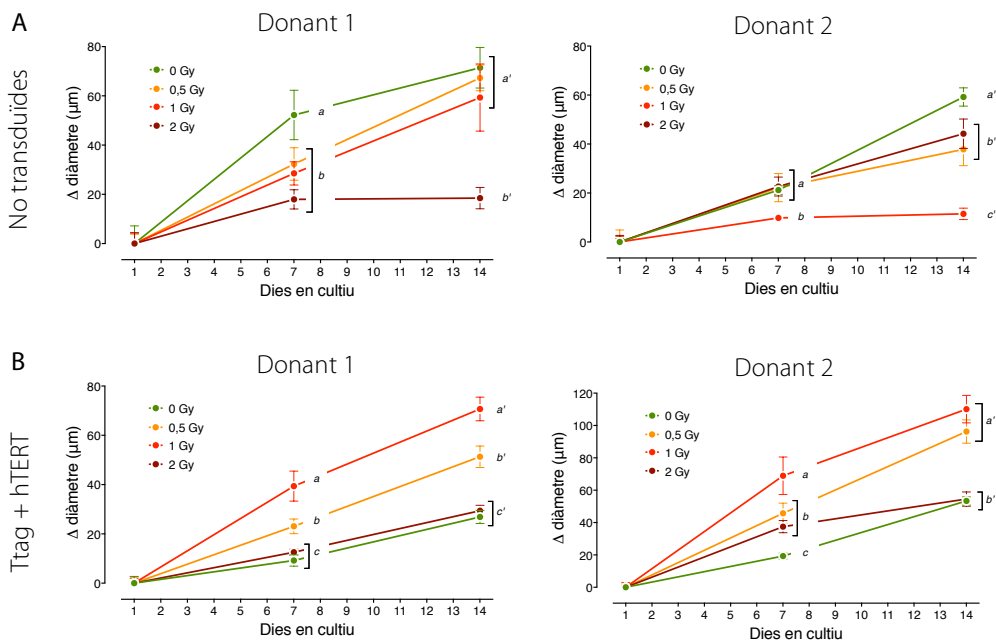


Figura 73. Increment del diàmetre dels acini formats al llarg del temps en cultiu per les cèl·lules provinents de la donant 1 i la donant 2. **A.** Increment de la mida dels acini formats per les cèl·lules no transduïdes. **B.** Increment de la mida dels acini formats per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*. Per cada mostra i per cada temps, els punts representen la mitjana i les barres l'error estàndard. Diferents lletres indiquen diferències estadísticament significatives entre el diàmetre dels acini al mateix temps en cultiu (ANOVA de dues vies amb correcció de Tukey per múltiples comparacions; $p < 0,05$).

Un cop transcorreguts 14 dies en cultiu, es va quantificar el **nombre d'acini formats** pels diferents cultius tridimensionals a partir de cèl·lules transduïdes i no transduïdes exposades a les diferents dosis de radiació. Els resultats van mostrar que, tot i manifestar-se en diferents magnituds, en les dues donants l'exposició a radiació va provocar una disminució en el nombre dels acini formats per cèl·lules no transduïdes respecte les cèl·lules no irradiades (Figura 74A). En el cas de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, l'exposició a radiació ionitzant no va comportar diferències importants en el nombre d'acini formats quan es van exposar a 0,5 o 1 Gy de raigs gamma; en canvi, aquelles cèl·lules irradiades amb 2 Gy van augmentar dràsticament el nombre d'acini formats (Figura 74B).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

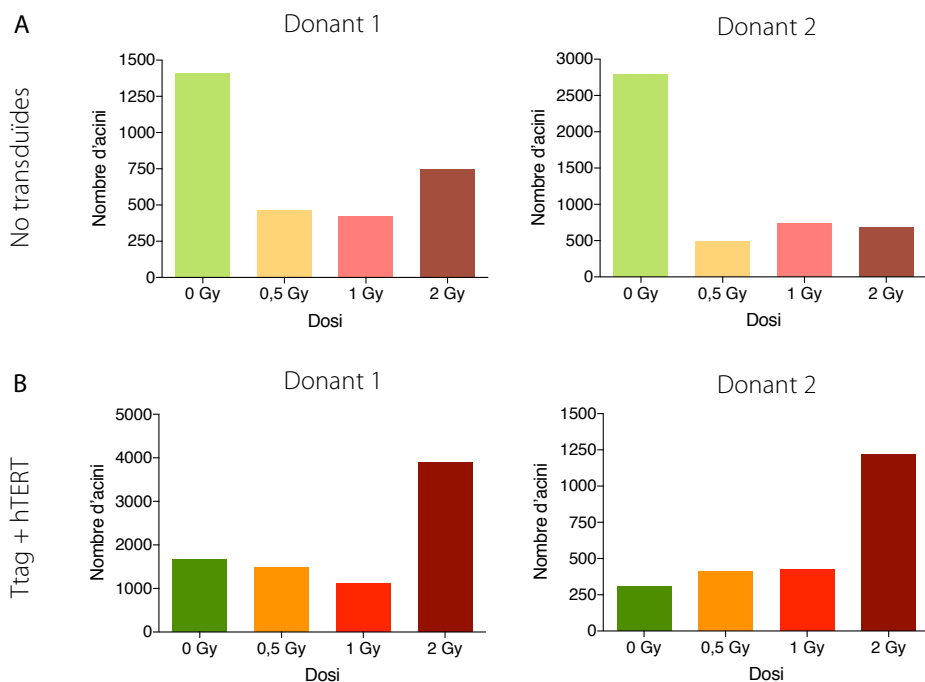


Figura 74. Recompte del nombre d'acini formats 14 dies després de sembrar 10.000 cèl·lules. **A.** Nombre d'acini formats per les cèl·lules no transduïdes. **B.** Nombre d'acini formats per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*.

Tant el nombre d'acini formats com el seu creixement són bons indicadors per estudiar els acini formats en Matrigel però són paràmetres que podrien estar estretament relacionats l'un amb l'altre. Donat que en tots els casos es va sembrar el mateix nombre de cèl·lules, un augment en l'agregació inicial de les cèl·lules donaria lloc a un augment de la mida dels acini i comportaria una conseqüent disminució en el nombre final d'acini; d'igual manera, una menor agregació inicial donaria lloc a nombrosos acini però de mida reduïda.

D'acord amb la fórmula descrita a l'apartat de Material i mètodes titulat "Identificació, recompte i mesura de colònies" per l'estimació del diàmetre que tindria una agrupació de cèl·lules a partir de l'eficiència d'empaquetament i el diàmetre de les cèl·lules que la formen, es va estimar el diàmetre teòric que presentarien els acini en funció del nombre de cèl·lules que els conformen (Figura 75). Per fer-ho es va tenir en compte que en tots els casos es van sembrar 100.000 cèl·lules en Matrigel amb un diàmetre mitjà de ~28 μm per cèl·lula. Es va considerar una eficiència de formació d'acini del 80% amb una eficiència d'empaquetament del 100% degut a la

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

gran plasticitat que presenten aquestes cèl·lules i la llibertat de moviment prèviament observada.

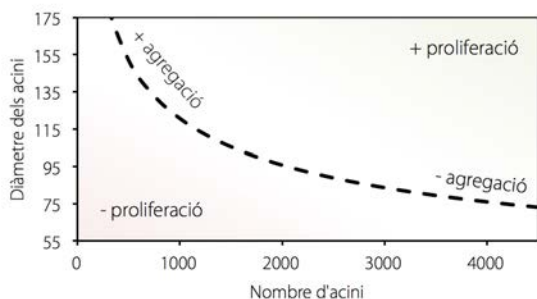


Figura 75. Estimació de la variació del nombre dels acini formats en funció de la seva mida.

Gràcies a la representació de la compensació teòrica estimada entre aquests dos paràmetres es va poder observar com la formació de pocs acini de gran mida podia equivaldre a la formació de pocs acini de menor mida. El motiu pel qual es donaria un cas o l'altre seria un augment o disminució de l'agregació inicial de les cèl·lules. Donat que l'estimació té en compte el nombre de cèl·lules inicial sense considerar la proliferació al llarg dels 14 dies en cultiu, a mesura que les cèl·lules que conformen els acini proliferen i augmenten en nombre també augmenta la mida dels acini situant-los per sobre del valor estimat.

Per tal de valorar si les diferències en el nombre d'acini formats i el seu creixement responien a una compensació entre aquestes dues variables o a altres factors interns o externs, es van representar conjuntament els valors de mida i de nombre dels acini formats. Això va permetre ubicar gràficament cada mostra en funció dels valors que presentava i comparar la seva disposició amb la de les altres mostres (Figura 76).

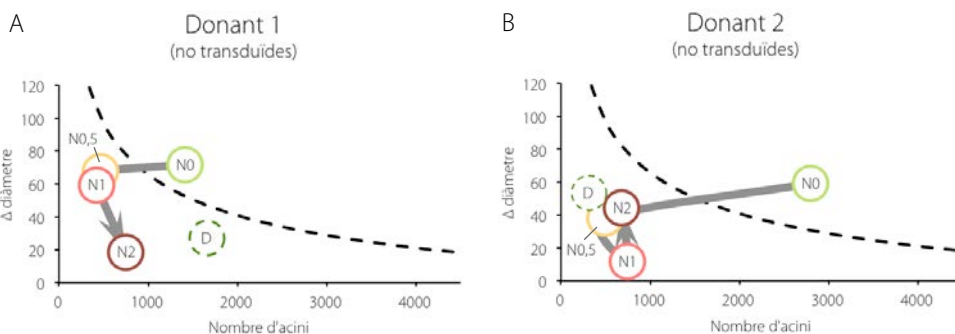


Figura 76. Relació entre l'increment del diàmetre i el nombre d'acini formats després de 14 dies en cultius tridimensionals en Matrigel per les cèl·lules no transduïdes (N) provinents de les donants 1 i 2 en funció de la dosi de radiació rebuda. El número que es mostra dins de cada cercle indica la dosi de radiació ionitzant

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

rebuda (0, 0,5, 1 i 2 Gy). S'indiquen també els valors obtinguts per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* (D) no irradiades. La línia discontinua mostra la compensació teòrica entre el nombre d'acini formats i l'increment de la seva mida.

La representació dels valors obtinguts per les cèl·lules no transduïdes provinents de les dues donants irradiades a diferents dosi va mostrar una clara disminució tant en el creixement com en el nombre d'acini formats en comparació amb els formats per les cèl·lules no irradiades., la radiació ionitzant va comportar que els acini formats per les cèl·lules no transduïdes presentessin certa similitud amb els acini formats per les cèl·lules doblement transduïdes (**Figura 76**). Concretament, en el cas de les cèl·lules provinents de la donant 1, les cèl·lules no transduïdes van formar acini amb un creixement cada vegada menor a mesura que augmentava la dosi de radiació ionitzant rebuda, mentre que paral·lelament es va veure una lleugera disminució en el nombre d'acini formats (**Figura 76A**). Per altra banda, les cèl·lules no transduïdes provinents de la donant 2 van reduir dràsticament el nombre d'acini formats quan es van exposar a raigs gamma, també van presentar una disminució en el creixement més o menys acusada en funció de la dosi rebuda (**Figura 76B**).

En conjunt, el patró observat tant en la donant 1 com en la donant 2 sembla indicar que, quan són irradiades, les cèl·lules no transduïdes tendeixen a formar acini similars als formats per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*: menys nombrosos i amb un menor creixement.

La resposta a la radiació de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* també coincideix en les dues donants estudiades. En tots dos casos es va observar un augment en el creixement dels acini formats per cèl·lules irradiades amb 0,5 i 1 Gy, i una brusca disminució del creixement acompanyada d'un major nombre d'acini formats per les cèl·lules irradiades a 2 Gy (**Figura 77**). Les diferències observades entre els acini formats per les cèl·lules irradiades amb 1 Gy o 2 Gy semblen respondre a una compensació entre l'increment del diàmetre i el nombre d'acini formats, ja que tots dos valors coincideixen amb l'estimació teòrica de relació entre aquests dos paràmetres.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

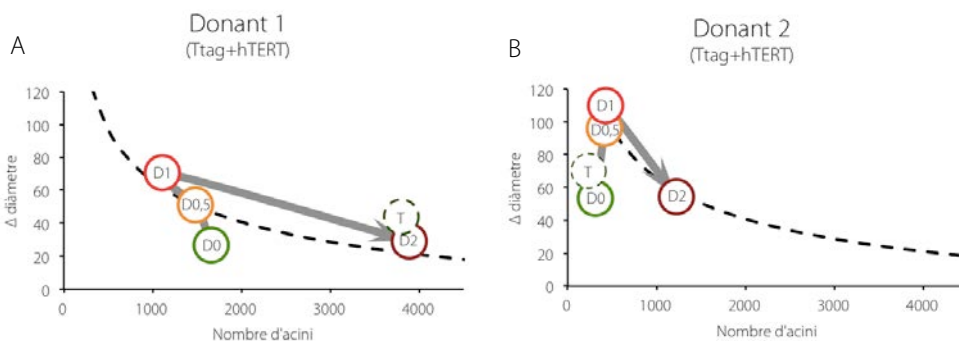


Figura 77. Relació entre l'increment del diàmetre i el nombre d'acini formats després de 14 dies en cultius tridimensionals en Matrigel per les cèl·lules provinents de les donants 1 i 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* (D) en funció de la dosi de radiació rebuda. El número que es mostra dins de cada cercle indica la dosi rebuda. S'indiquen també els valors obtinguts per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (T). La línia discontinua mostra la compensació teòrica entre el nombre d'acini formats i l'increment de la seva mida.

D'igual manera que les cèl·lules no transduïdes irradiades van formar acini similars als de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, els acini formats per les cèl·lules provinents de la donant 1 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i irradiades a 2 Gy van assolir valors d'increment de diàmetre i nombre d'acini formats similars als observats en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (Figura 77A). En el cas de les cèl·lules provinents de la donant 2 transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* ja van formar acini amb una gran similitud amb els formats per les cèl·lules triplement transduïdes. En aquest cas, tot i formar globalment menys acini i de major diàmetre, la resposta a la radiació va ser idèntica a la observada per les cèl·lules provinents de la donant 1: formar acini més grans quan s'exposaven a dosis de 0,5 Gy i 1 Gy i formar acini més petits però nombrosos quan s'exposaven a 2 Gy (Figura 77B).

En conjunt els resultats semblen indicar que la resposta a la radiació en termes de formació d'acini és completament oposada entre les cèl·lules no transduïdes i les parcialment transformades amb *Ttag* i *hTERT*. Mentre que les no transduïdes disminueixen tant el nombre d'acini formats com el seu creixement, els acini provinents de cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* augmenten el seu creixement a mesura que incrementa la dosi de radiació rebuda.

Polaritat dels acini

Gràcies a les característiques del Matrigel, i tal com demostra el registre d'imatges en *time-lapse* descrit a l'apartat titulat "Formació dels acini", les BPECs poden moure's lliurement dins la matriu extracel·lular fet que els hi permet organitzar-se amb les cèl·lules veïnes. En aquest sentit, diversos autors han estudiat la posició que ocupen les cèl·lules luminals i mioepitelials dins els acini. Segons descriuen, els diferents tipus cel·lulars s'organitzen simulant la disposició que s'observa a la glàndula mamària (Petersen *et al.*, 1992; Gudjonsson *et al.*, 2002; Zubeldia-Plazaola *et al.*, 2015).

A les estructures acinars presents a la mama, la disposició de les cèl·lules respon a una localització funcional: cèl·lules luminals productores de llet es troben encarades a la llum del túbul i rodejades de cèl·lules mioepitelials amb capacitat contràctil. En el cas dels cultius tridimensionals *in vitro*, la polarització dels acini és indicadora de que les cèl·lules mantenen la capacitat d'ordenar-se simulant la funció que exercien *in vivo*. En aquest sentit, la pèrdua de polaritat es pot entendre com una pèrdua de la funcionalitat de les cèl·lules ja que, en cas de trobar-se en un ambient fisiològic, no podrien realitzar la seva funció correctament.

Per tal de valorar la polaritat dels acini formats en cultius tridimensionals en Matrigel per les cèl·lules transduïdes i no transduïdes provinents de les dues donants i irradiades a diferents dosis, es va realitzar una immunodetecció de les proteïnes citoqueratina 14 i claudina 4, marcadors específics de cèl·lules mioepitelials i luminals respectivament.

La valoració de les preparacions es va realitzar amb l'ajuda d'un microscopi confocal. Es va considerar que els acini presentaven polarització quan s'observava una disposició perifèrica de cèl·lules positives per citoqueratina 14, mentre que les cèl·lules internes presentaven marcatge per claudina 4 (Figura 78A). Per contra es van classificar els acini com a no polaritzats quan les cèl·lules d'un o altre tipus es trobaven en una ubicació que no els pertanyia (Figura 78B).

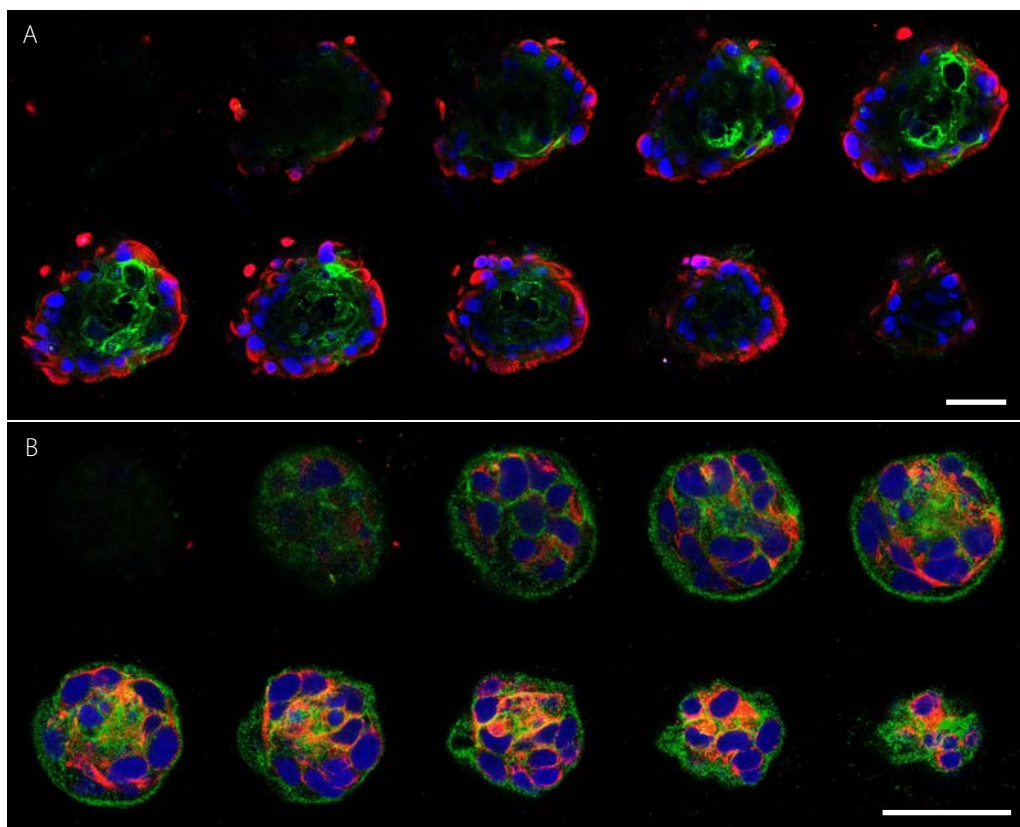


Figura 78. Imatges representatives de la valoració de la polaritat en els acini formats en cultius tridimensionals en Matrigel. Es representen diferents plans de l'acinus on s'observa la disposició de les cèl·lules positives per citoqueratina 14 en vermell, i positives per claudina 4 en verd **A.** Exemple d'acini polaritzat on s'hi pot observar la disposició perifèrica de les cèl·lules amb característiques mioepiteliais i la posició central de les cèl·lules amb característiques luminals. **B.** Exemple d'acini no polaritzat. S'hi pot observar la presència de cèl·lules positives per un o altre marcatge tant en posició perifèrica com central. Barra d'escala 50 μ m.

A partir de la valoració de la polaritat dels acini formats per les cèl·lules no transduïdes, les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i les transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* provinents de la **donant 1**, es va observar com la transducció no va comportar variacions significatives en la polarització dels acini (**Figura 79**). En el cas dels acini formats per les cèl·lules no transduïdes, es va observar com, independentment de la dosi de radiació rebuda, el percentatge d'acini polaritzats es mantenia al voltant del 90%. En el cas dels acini formats per les cèl·lules de la mateixa donant transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* presentaven un nivell de polarització similar a les cèl·lules no transduïdes. Tot i així, en aquest cas es va observar una clara disminució en la seva polaritat a mesura que augmentava la dosi de radiació rebuda fins arribar a observar només un 30% dels acini polaritzats en el cas dels formats a partir de cèl·lules irradiades amb 2 Gy (**Figura 79**).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

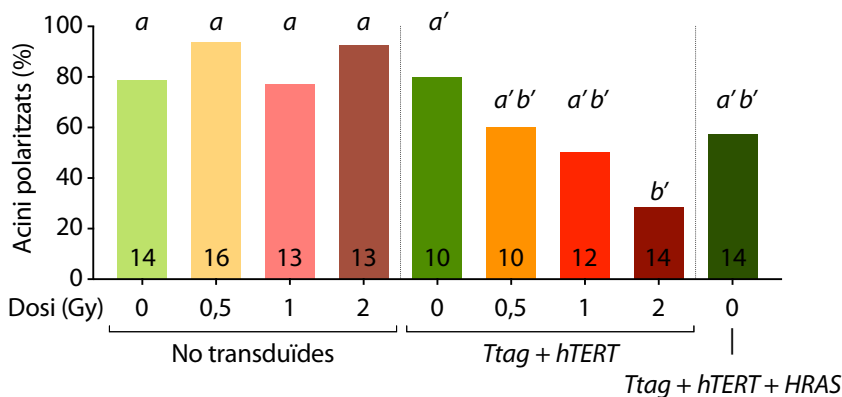


Figura 79. Percentatge d'acini polaritzats observats als diferents cultius derivats de les cèl·lules de la donant 1. A l'interior de cada columna s'indica el nombre d'acini analitzats per cada mostra. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres (test exacte de Fisher; $p < 0,05$).

En el cas dels acini formats per les cèl·lules provinents de la **donant 2** no transduïdes, transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*, tampoc es va observar una disminució de la polaritat en funció dels transgens introduïts (**Figura 80**). Pel que fa als acini formats per les cèl·lules no transduïdes no es va observar cap diferència significativa entre els acini formats per cèl·lules irradiades o per cèl·lules no irradiades. Els acini formats per les cèl·lules de la mateixa donant transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* van presentar una certa disminució en la polarització dels acini en algunes de les mostres irradiades tot i que les diferències no van ser estadísticament significatives (**Figura 80**).

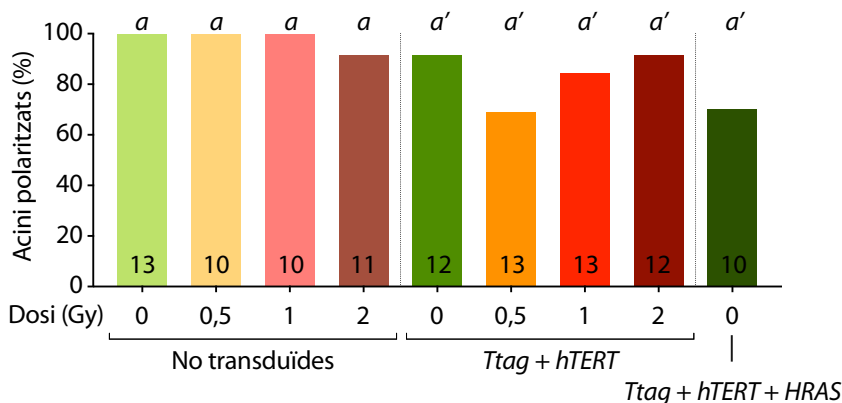


Figura 80. Percentatge d'acini polaritzats observats als diferents cultius derivats de les cèl·lules de la donant 2. A l'interior de cada columna s'indica el nombre d'acini analitzats per cada mostra. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre les mostres (test exacte de Fisher; $p < 0,05$).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

En resum, la polaritat dels acini no van presentar diferències significatives entre aquelles cèl·lules no transduïdes i les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* o amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*. Tot i així, a mesura que incrementava la dosi de radiació rebuda, es va observar una disminució de la polaritat de les cèl·lules parcialment transformades (transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*) en una de les donants. Aquest fet suggereix que la capacitat d'organitzar-se per formar acini polaritzats es manté fins i tot en aquelles cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* però es pot veure afectat per la exposició a radiació ionitzant.

Perfil d'expressió gènica

Els mètodes que es basen en la caracterització del comportament o l'estudi del fenotip de les cèl·lules en cultiu permeten determinar si presenten característiques típiques del procés de transformació. Un d'aquests mètodes es basa en l'estudi de l'expressió gènica, la qual pot canviar com a resultat d'alteracions en el genoma.

Per tal d'estudiar el perfil d'expressió gènica dels diferents cultius es va utilitzar el mètode d'Anàlisi Predictiu de Microarray o PAM (de les sigles en anglès de *Prediction Analysis of Microarray*). Tot i que existeixen diferents versions del PAM que contenen diferents grups de gens, en el present anàlisi es va estudiar el nivell d'expressió de 50 gens biomarcadors (PAM50) específicament escollits per caracteritzar mostres de càncer de mama (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2009; llista de gens detallada a l'Annex).

La utilització d'aquesta metodologia per estudiar l'expressió gènica dels cultius cel·lulars permet obtenir informació referent a la similitud d'aquestes mostres experimentals amb les tipologies amb què es classifica el càncer de mama. Tot i que el resultat del PAM50 per se no dóna informació dels nivells d'expressió de cadascun dels biomarcadors, aquesta informació és necessària per poder fer la classificació. En el present estudi, ens hem servit de les dades obtingudes per poder quantificar els nivells d'expressió dels 50 gens de forma individualitzada per cada mostra i comparar-los entre elles. Aquesta informació és de gran interès per veure quins gens es veuen alterats al llarg del procés de transformació experimental, independentment de si els canvis afecten o no a la classificació del subtipus intrínsec de càncer de mama.

Resultats del PAM50

La transducció de les BPEC amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* pretén modificar l'expressió gènica de les cèl·lules epitelials mamàries de forma controlada per tal de que presentin característiques típiques de cèl·lules tumorals. Aquests elements genètics no s'inclouen directament dins la llista de gens analitzats pel PAM, tot i així, la transformació experimental pot comportar canvis en el nivell d'expressió gènica d'altres gens que sí es contemplen en aquest anàlisi. De la mateixa manera, se sap que la irradiació de cèl·lules també pot comportar canvis en els nivells d'expressió bé per la mutació de gens o de regions reguladores de l'expressió o bé per l'alteració que aquestes comporten sobre l'expressió de gens relacionats. Per tal de valorar si la transformació

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

experimental de les BPEC o la seva irradiació va donar lloc a alteracions gèniques típiques d'alguns dels subtipus en els que es pot classificar el càncer de mama es va analitzar el perfil d'expressió dels biomarcadors descrits al PAM50 dels diferents cultius de BPEC utilitzats. Concretament, tant per la donant 1 com per la donant 2, es va analitzar RNA de cèl·lules no transduïdes, transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*, així com RNA de cèl·lules no transduïdes i transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* extret 8 setmanes després d'haver-les exposat a 0,5, 1 i 2 Gy de radiació ionitzant de tipus γ . Per tal de disposar de controls externs, es van afegir mostres d'RNA provinents de cèl·lules MCF10A i MCF7. Així doncs, es van analitzar un total de 55 gens (50 biomarcadors + 5 gens control) en 20 mostres, totes elles per triplicat (taula de les mostres incloses a l'anàlisi a l'Annex).

Per dur a terme l'anàlisi d'expressió gènica es va quantificar el nombre de trànscrips de cadascun dels 55 gens inclosos al PAM mitjançant el *Sistema d'expressió gènica nCounter NanoString* (Geiss *et al.*, 2008). A partir dels valors obtinguts es van calcular diferents paràmetres diagnòstics entre els quals es troben el subtipus intrínsec de càncer de mama, el risc de recaiguda (ROR) o la taxa de proliferació que presenta cada mostra. Els algorismes utilitzats en el mètode de diagnòstic PAM per calcular els diferents paràmetres es troben patentats (número de patent: EP 2297359 B1; Perou *et al.*, 2013).

L'anàlisi per determinar el **subtipus intrínsec de càncer de mama** consisteix en puntuar els diferents subtipus (Basal, Her2, Luminal A, Luminal B i Normal) en funció del nivell d'expressió de d'un conjunt específic de gens que presenta la mostra. El subtipus que obté una puntuació més alta és el que s'assigna a la mostra analitzada, tot i així, la resta de puntuacions rebudes pels altres subtipus també són d'interès per la interpretació dels resultats.

Els resultats obtinguts van indicar una gran similitud entre les mostres de la donant 1 i de la donant 2. En tots els casos l'anàlisi va classificar les mostres en primera opció com a subtipus intrínsec Basal (Figura 81) amb excepció de la mostra control MCF7 que es va classificar com a subtipus Her2/Luminal coincidint amb la classificació d'aquest tipus cel·lular feta per altres autors (Perou *et al.*, 2000; Prat i Perou, 2011). El fet que totes les mostres, tant abans com després de ser transduïdes i/o irradiades, es consideressin com mostres tumorals era esperable ja que les mostres analitzades provenien de cultius in vitro enlloc de teixit mamari sa, que és el tipus de mostra que es va utilitzar per determinar el subtipus normal. Aquest resultat indica que el cultiu

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

in vitro de les cèl·lules derivades de teixit mamari sa altera el perfil d'expressió gènica de forma prou significativa com perquè l'anàlisi PAM les identifiqüi com a un subtipus de càncer de mama.

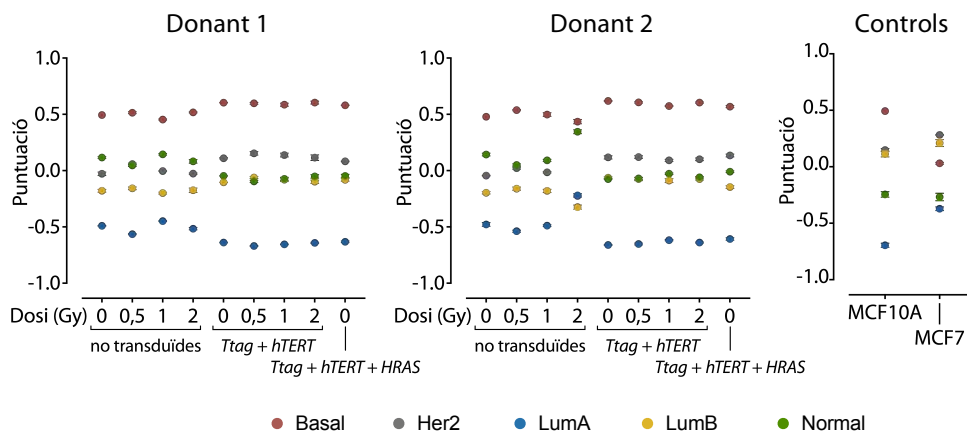


Figura 81. Puntuacions de les diferents mostres pels diferents subtipus intrínsecs de càncer segons l'algoritme utilitzat al PAM.

Tenint en compte les puntuacions obtingudes en segona posició, es va observar com les cèl·lules no transduïdes tant de la donant 1 com la donant 2 es van classificar majoritàriament com a subtipus Normal mentre que les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* o *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van obtenir una puntuació més elevada en el subtipus Her2.

El paràmetre **risc de recaiguda** (ROR) permet valorar la probabilitat de reparació d'un tumor. Com major és el ROR major és la probabilitat de que el tumor reapareixi comportant un pitjor pronòstic. L'anàlisi del ROR en les diferents mostres analitzades va mostrar una clara similitud entre les cèl·lules derivades de les dues donants (Figura 82). En tots dos casos es va observar un increment estadísticament significatiu del ROR en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i les transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* respecte les cèl·lules no transduïdes. Tot i així, no es van observar diferències pel que fa a les cèl·lules irradiades respecte les mostres homòlogues no irradiades. La **taxa proliferativa** (*proliferation score*) reflecteix la capacitat de divisió de cada mostra en funció de gens implicats en la proliferació. D'igual manera que el ROR, la taxa proliferativa també va presentar un increment en aquelles cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* o *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* respecte les no transduïdes de forma molt similar en les dues donants (Figura 82). Tanmateix, en el cas de les cèl·lules no transduïdes i irradiades a 2 Gy, es va observar una disminució de la taxa proliferativa en comparació amb els nivells que presentaven les altres dosis, especialment la donant 1.

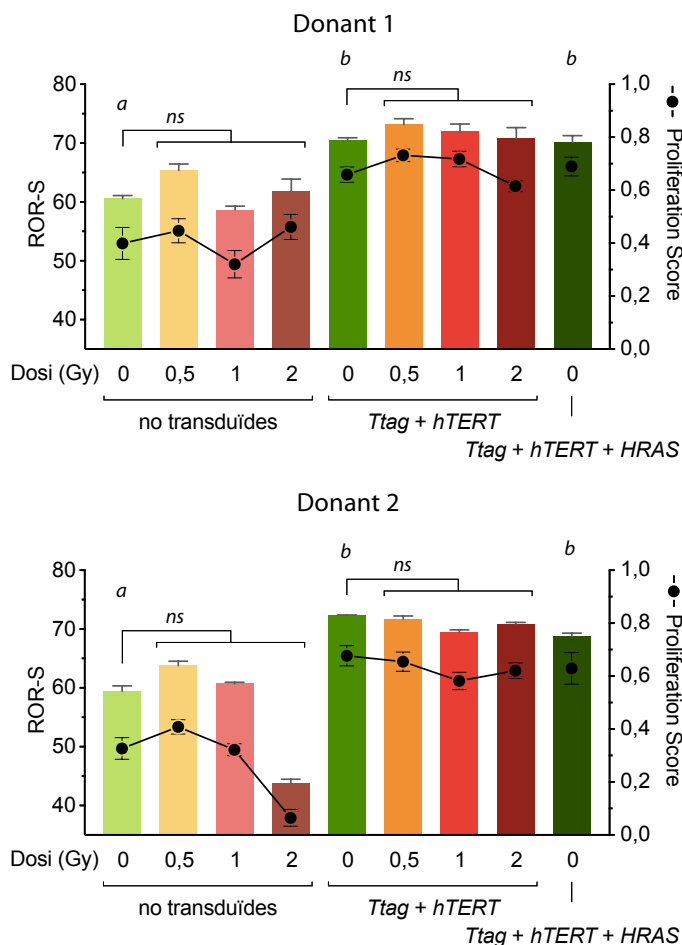


Figura 82. Representació dels valors de ROR-S i Proliferation Score obtinguts a partir de l'anàlisi d'RNA dels diferents cultius de BPECs analitzats amb el PAM. Comparacions aparellades amb Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

En resum, considerant conjuntament els paràmetres aportats per l'anàlisi PAM es van poder distingir les cèl·lules no transduïdes de les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* o amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* en funció dels paràmetres subtipus, ROR i taxa de proliferació però no es va observar cap efecte en la puntuació d'aquests paràmetres a causa de l'exposició a radiació ionitzant.

Efecte de la transducció sobre l'expressió gènica dels biomarcadors

A partir dels valors d'expressió de cadascun dels 50 biomarcadors inclosos en el PAM50, es van analitzar les alteracions en el perfil d'expressió de cadascun dels gens entre les diferents mostres.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Els nivells d'expressió de les cèl·lules no transduïdes provinents de les dues donants presentaven un 98% de similitud (54 dels 55 gens analitzats). Pel que fa a les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* les alteracions en l'expressió gènica entre les dues donants se centraven en els nivells específics d'expressió de cadascun dels biomarcadors. Concretament, 53 dels 55 gens (96%) es van veure alterats en el mateix sentit a les dues donants (augment o disminució respecte les cèl·lules no transduïdes). Per últim, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* de les dues donants van presentar els mateixos nivells d'expressió en 43 dels 55 (78%) gens analitzats. En conjunt, aquests anàlisi comparatiu va posar de manifest la similitud en el perfil d'expressió gènica entre les cèl·lules provinents de les dues donants en cadascun dels casos analitzats.

Pel que fa a les alteracions específiques observades com a conseqüència de la transducció amb els diferents transgens, en totes dues donants es va observar un gran canvi en el perfil d'expressió en aquelles cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* o amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* respecte les no transduïdes, mentre que les diferències observades entre les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i les transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van ser mínimes (**Figura 83A**). Per tal d'identificar quins eren els gens alterats a causa de la transducció amb els diferents elements gènics, únicament es van seleccionar aquells gens significativament alterats respecte les cèl·lules no transduïdes ($p < 0,05$; $FDR < 5\%$) i que presentaven uns nivells d'expressió amb un $\log_2(FC)$ superior a 1 o inferior a -1. Això implica que per considerar un gen amb expressió disminuïda ha de presentar com a mínim la meitat d'expressió que el control, mentre que per ser considerat amb expressió augmentada ha de presentar com a mínim el doble d'expressió que el control (llista de gens alterats detallada a l'Annex).

Pel que fa a les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* es van detectar 42 gens amb expressió alterada respecte les cèl·lules no transduïdes, 32 dels quals estaven alterats a les cèl·lules tant de la donant 1 com de la 2, mentre que només hi havia 3 gens exclusivament alterats a la donant 1 i 7 a la donant 2 (**Figura 83B**). Pel que fa a l'anàlisi dels gens significativament alterats en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*, la major part d'aquests ja ho estaven en les cèl·lules transduïdes només amb *Ttag* i *hTERT*. Concretament, 29 dels 37 gens alterats en la donant 1 a causa de la transducció amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* ja estaven alterats en aquelles cèl·lules transduïdes únicament amb *Ttag* i *hTERT*; en el cas de la donant 2, 13 dels 14 gens alterats amb la transducció dels tres elements gènics ho estaven prèviament amb la transducció amb *Ttag* i *hTERT*. Els pocs gens exclusivament alterats en les cèl·lules transduïdes amb tres elements (8

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

gens alterats en la donant 1; 1 gen alterat en la donant 2) no van presentar cap coincidència entre les dues donants (Figura 83B).

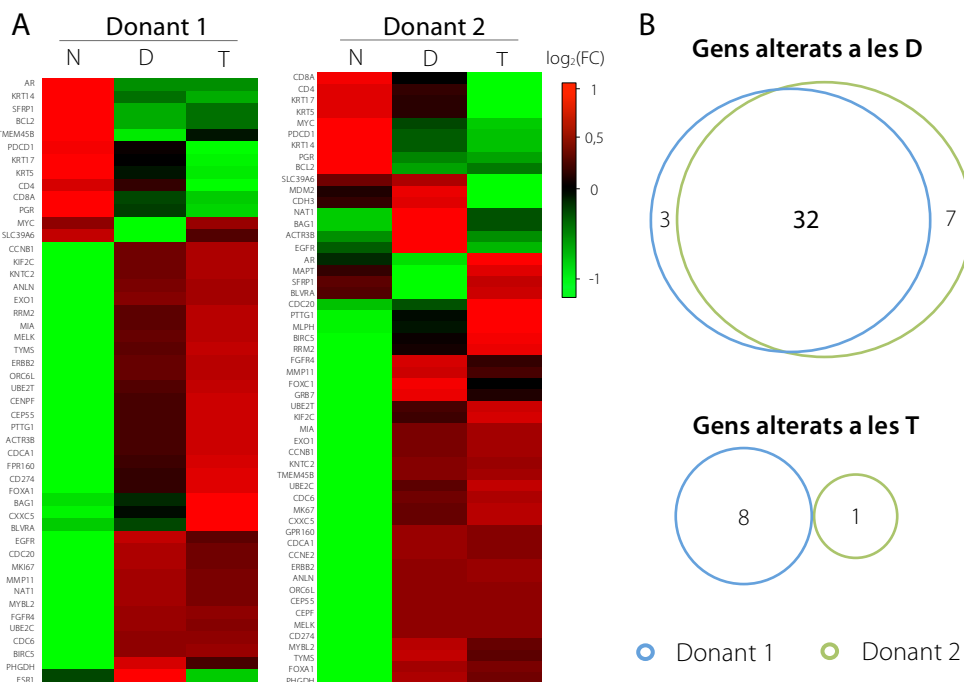


Figura 83. Diferències d'expressió entre les mostres no transduïdes (N), transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* (D) i transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* (T). **A.** Heatmap expressió N vs D vs T. **B.** Diagrames de Venn amb àrea proporcional on es comparen els gens amb expressió alterada ($\log_2(FC) > 1$ o $\log_2(FC) < -1$) a les dues donants entre les cèl·lules D i les N (diagrama superior) i els gens alterats entre les T i les N (diagrama inferior) excloent les alteracions ja presents entre D i N.

En el cas concret de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de les dues donants, per tal de conèixer l'efecte dels 32 gens que presentaven canvis d'expressió respecte les cèl·lules no transduïdes (Figura 83B), es va consultar quina era la funció de cadascun dels gens alterats. En funció del seu paper a nivell cel·lular, es van classificar en les diferents habilitats biològiques de les cèl·lules tumorals definides per Hannahan i Weinberg el 2011. Vint-i-vuit dels 32 gens (87,5%) comunament alterats a les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de les dues donants podrien estar implicats en 7 de les 10 categories definides per Hannahan i Weinberg (Figura 84; Taula 8).

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

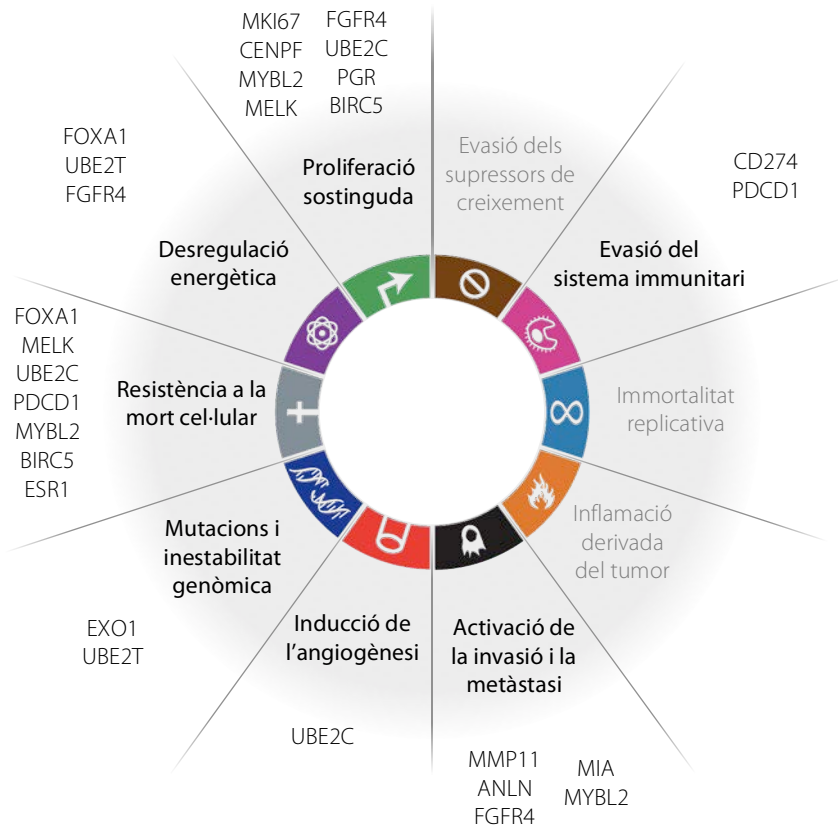


Figura 84. Classificació dels gens alterats en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* en les dues donants segons la relació amb les principals característiques involucrades en la progressió del càncer descrites per Hanahan i Weinberg el 2011.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Taula 8. Gens comunament alterats a les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* en les dues donants. Llegenda: Expressió augmentada (▲), expressió disminuïda (▼); proliferació sostinguda (●), evasió dels supressors de creixement (●), evasió del sistema immunitari (●), inflamació derivada del tumor (●), activació de la invasió i la metastasi (●), inducció de l'angiogènesi (●), mutacions i inestabilitat genòmica (●), resistència a la mort cel·lular (●), desregulació energètica (●).

Gen	Expressió	Hallmark	Funció
ANLN	▲	●	Participació en la formació de l'anell contràctil i la migració en certs tipus cel·lulars.
BIRC5	▲	● ●	Paper en la proliferació cel·lular i la prevenció de l'apoptosi.
CCNB1	▲	●	Paper essencial en el control de la transició G2/M del cicle cel·lular.
CD274	▲	●	Participació en la inhibició de la resposta immunitària; la sobreexpressió permetria evadir el sistema immunitari.
CD4	▼	●	Glicoproteïna de membrana involucrada en l'activació de la resposta immunitària.
CDC6	▲	●	Regulació primerenca de la replicació del DNA.
CDCA1	▲	●	Correcte funcionament del centròmer durant la divisió cel·lular.
CENPF	▲	●	Paper essencial per la funcionalitat del cinetocor i la correcta segregació dels cromosomes.
CEP55	▲	●	Finalització de la mitosi i la citocinesi.
ESR1	▲	●	Receptor relacionat amb vies de senyalització anti-apoptòtiques.
EXO1	▲	●	Activitat exonucleasa en les vies de reparació per desaparellament de bases i en la recombinació homòloga.
FGFR4	▲	●	Receptor de membrana involucrat en la transducció de senyal mitogènic.
FOXA1	▲	●	Regulació del metabolisme cel·lular i inhibició d'elements pro-apoptòtics.
GPR160	▲	● ●	Possible implicació en processos anti-apoptòtics i l'evasió dels supressors de tumors.
KIF2C	▲	●	Participació en la despolimerització dels microtúbuls durant l'anafase.
KNTC2	▲	●	Paper en l'estabilització de la unió entre el cinetocor i els microtúbuls.
MELK	▲	● ●	Inhibidor d'elements pro-apoptòtics i participació en la proliferació cel·lular.
MIA	▲	●	Mediador de la capacitat invasiva i migratòria en melanoma.
MKI67	▲	●	Paper en l'organització de la cromatina i la proliferació cel·lular.
MMP11	▲	●	Participació en la ruptura de la matriu extracel·lular.
MYBL2	▲	● ● ●	Rol en la supervivència cel·lular i la progressió del cicle cel·lular, migració i invasió.
NAT1	▲	●	Acetilació d'arilamines i substrats d'hidracina; relació amb càncer colorectal.
ORC6L	▲	●	Subunitat del complex ORC involucrat en l'inici de la fase S, la segregació i la citocinesi.
PDCD1	▼	● ● ●	Inductor de la mort cel·lular; inhibidor de la proliferació i la producció de citoquines; regulació negativa i evasió del sistema immunitari.
PGR	▼	●	Participació en la disminució de la proliferació.
SFRP1	▼	●	Implicació en la regulació de la via de Wnt.
UBE2C	▲	● ● ●	Regulació de l'expressió de gens relacionats amb creixement, apoptosi i angiogènesi.
UBE2T	▲	● ●	Paper en la degradació de BRCA1; relació amb metastasi en càncer de pròstata.

Efecte de la radiació sobre l'expressió gènica

A diferència de la transducció amb vectors lentivirals, l'exposició a radiació ionitzant pot comportar l'alteració dels nivells d'expressió dels gens de forma aleatòria. Ara bé, com major és la dosi, major s'espera que sigui el nombre de casos on la reparació del dany sigui il·legítima i es produeixin alteracions en el genoma que acabin donant lloc a diferències en els nivells d'expressió gènica.

Tenint en compte només aquells gens significativament alterats respecte les cèl·lules no irradiades ($p \leq 0,05$; $\log_2(FC) > 1$ o $\log_2(FC) < -1$) es va observar com els gens amb expressió alterada a causa de la radiació van ser majoritàriament exclusius d'una o altra donant (Figura 85), fet que concordaria amb la idea que les alteracions generades per la radiació són aleatòries.

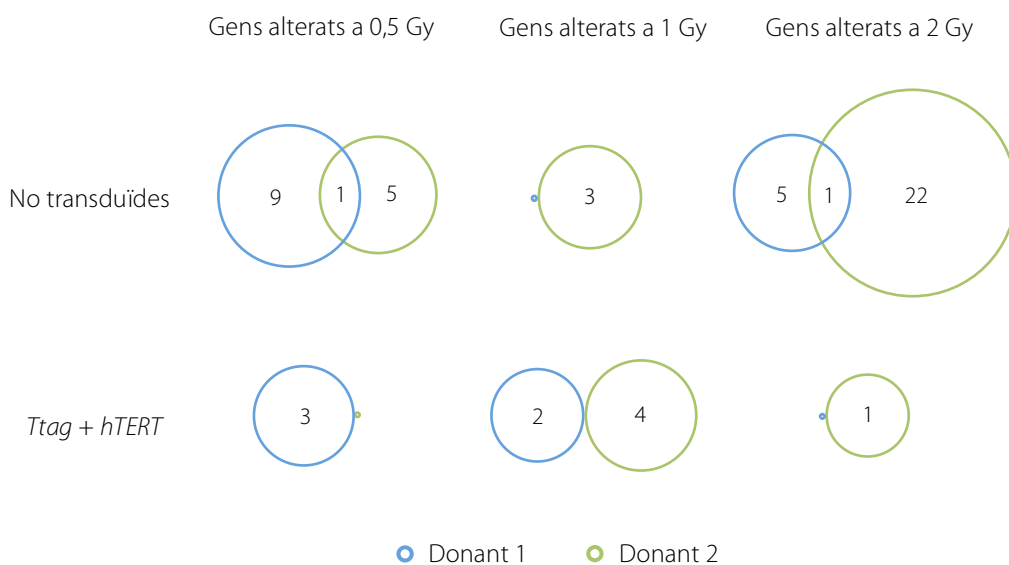


Figura 85. Gens comunament alterats en les cèl·lules de la donant 1 i la donant 2 en funció de la dosi de radiació rebuda.

En el cas de les cèl·lules no transduïdes provinents de la donant 1 no transduïdes es va observar un total de 16 gens alterats a causa de la radiació, mentre que pel que fa a les cèl·lules no transduïdes provinents de la donant 2 van ser 32 els gens alterats (Figura 85). En tots dos casos, aproximadament un 50% de les alteracions estaven relacionades amb característiques típiques de les cèl·lules tumorals definides per Hannahan i Weinberg el 2011 (8 de 16 en la donant 1; 15 de 32 en la donant 2). L'elevat nombre de gens involucrats en el procés tumoral suggereix que els canvis d'expressió gènica que es mantenen alterats 8 setmanes després de l'exposició

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

aportarien alguna avantatge a les cèl·lules. De fet, en el cas de les cèl·lules no transduïdes provinents de la donant 2, 12 dels 32 (38%) gens alterats en alguna de les dosis també es trobaven alterats a les cèl·lules d'aquesta mateixa donant transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* i coincidien amb la seva tendència (augment o disminució de l'expressió). Aquest fet suggereix que la radiació va generar alteracions diferents a la transducció, però al llarg de les 8 setmanes post-irradiació es van seleccionar positivament aquelles cèl·lules que, com en el cas de les transduïdes, presentaven alteracions en gens relacionats amb el procés de transformació.

En el cas de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, es van observar molt poques alteracions degudes a l'exposició a radiació ionitzant (**Figura 85**), probablement perquè ja presentaven un nombre important d'alteracions respecte les cèl·lules no transduïdes i perquè en l'anàlisi PAM50 només s'analitzen 55 gens. Això dificultaria que les alteracions que poguessin afectar aleatòriament a aquestes cèl·lules milloressin la seva capacitat de creixement com en el cas de les cèl·lules no transduïdes.

En conjunt, els resultats obtinguts a partir dels gens alterats a causa de la radiació reafirmen el fet que, a diferència de la transducció amb *Ttag* i *hTERT*, la radiació produeix alteracions gèniques aleatòries i, per tant, canvis en l'expressió gènica també a l'atzar. Tot i així, els canvis d'expressió que romanen alterats 8 setmanes després de l'exposició no semblen aleatòries ja que es mantenen preferentment aquelles alteracions que aporten algun avantatge biològic per la cèl·lula.

Discussió

Obtenció i cultiu de les BPEC

La radiació és un agent mutagènic àmpliament utilitzat en procediments tant medico-diagnòstics com en el tractament d'algunes malalties com el càncer. El dany infligit per l'exposició a radiació ionitzant sobre les cèl·lules depèn de la dosi rebuda (Vilenchik i Knudson, 2003). Per altra banda, la transformació tumoral de les cèl·lules sanes és un procés gradual en què s'acumulen múltiples alteracions (Hanahan i Weinberg, 2011). En el present treball es planteja estudiar la contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular experimental. Per tal d'analitzar si l'exposició a dosis moderades de radiació és capaç d'induir canvis en el genoma de les cèl·lules de la mama que condueixin a una transformació maligna d'aquestes, es va estudiar la susceptibilitat de cèl·lules parcialment transformades a esdevenir plenament transformades a causa de l'exposició a radiació ionitzant. Aquesta anàlisi es va realitzar en cèl·lules derivades de teixit mamari sa cultivades seguint les condicions descrites pel grup de Robert Weinberg (Ince *et al.*, 2007). S'havia descrit que aquest mètode permetia mantenir en cultiu la població de cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals, responsables de la major part dels tumors originats a la mama. Així doncs es va decidir estudiar l'efecte que pot tenir la radiació sobre aquestes cèl·lules donada la seva importància en aquest tipus de càncer.

En el mateix estudi es va descriure la inducció d'un procés de transformació experimental en cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals, revelant que les cèl·lules obtingudes eren capaces de formar tumors amb gran similitud als adenocarcinomes mamaris humans (Ince *et al.*, 2007). Davant d'aquests resultats es va desenvolupar un model experimental per estudiar la transformació radioinduída en cèl·lules derivades de teixit mamari sa basat en el model descrit per Weinberg i el seu equip.

L'ús de les BPEC per establir un model de transformació experimental sobre el que estudiar l'efecte de la radiació ha presentat certes dificultats tècniques (per la gran dedicació que requereix el manteniment de les BPEC) i econòmiques (pels ~700€/L que costa del medi WIT). Tot i això, l'ús d'aquesta metodologia presenta múltiples avantatges. El medi WIT no se suplementa amb sèrum com la majoria de medis de cultius sinó que té una formulació detallada que permet tenir un control absolut dels suplementes utilitzats. A diferència d'altres condicions de cultiu, el medi WIT i la superfície Primaria permeten l'obtenció d'un cultiu mixt de cèl·lules epitelials mamàries amb un enriquiment de cèl·lules amb característiques luminals (~20%)

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

mantingut al llarg del temps en cultiu, tal com mostren els recomptes de cèl·lules positives per citoqueratina 14 i claudina 4. En aquest sentit, altres estudis han descrit mètodes per mantenir en cultiu cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals. Ethier i col·laboradors van cultivar cèl·lules positives pel marcador típic del llinatge luminal citoqueratina 19 durant 2-3 passatges abans no adoptessin una morfologia típicament senescent (Ethier *et al.*, 1993). De forma similar, Péchoux i col·laboradors van descriure un medi de cultiu, el CDM6, que permetia perllongar en cultiu les cèl·lules fins a 7 passatges (Péchoux *et al.*, 1999). Per altra banda, Matoušková i col·laboradors van cultivar les cèl·lules epitelials mamàries sobre una monocapa de cèl·lules *feeders* però, tot i que la proporció de cèl·lules amb característiques luminals va incrementar fins a un 90%, tampoc van poder-les cultivar durant més de 6-7 passatges (Matoušková *et al.*, 2000). Així doncs, a diferència d'altres mètodes de cultiu, el medi WIT i la superfície Primaria han permès mantenir en cultiu cèl·lules epitelials mamàries amb característiques luminals durant més de 20 passatges, inclús després de múltiples infeccions amb partícules lentivirals i la seva posterior selecció.

Alguns autors han descrit una disminució al llarg del cultiu dels marcadors moleculars utilitzats per distingir els diferents llinatges de cèl·lules epitelials mamàries (Hines *et al.*, 2014; Zubeldia-Plazaola *et al.*, 2015). En aquest sentit, els percentatges de cèl·lules positives per citoqueratina 14 i claudina 4 s'han mantingut constants al llarg del temps en cultiu i tampoc es va observar canvi en el nombre de cèl·lules que no presentaven els marcadors analitzats, que es va mantenir al voltant del 5% en tots els cultius analitzats.

L'establiment d'un cultiu mixt on hi conviuen cèl·lules epitelials mamàries de diferents llinatges permet estudiar la disposició de les cèl·lules en tres dimensions i comparar-la amb la histologia que mostren a la mama. En aquest sentit, l'estudi dels acini formats en Matrigel ha permès demostrar mitjançant el *time-lapse* que aquests es formen per agregació de diferents cèl·lules veïnes durant les primeres hores i que, transcorregudes dues setmanes de constant proliferació, els acini formats presenten una clara polarització. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts per altres autors en estudis similars on s'ha observat la posició perifèrica de les cèl·lules amb característiques mioepitelials rodejant les cèl·lules amb marcadors luminals concordant amb la posició que adopten aquests tipus cel·lulars en els acini de la glàndula mamària (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989; Gudjonsson *et al.*, 2002). Recentment s'ha descrit que durant el cultiu *in vitro* dels acini es produeix un moviment intern de les cèl·lules a l'interior dels acini

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

juntament amb un moviment rotatori constant d'aquests (Wang *et al.*, 2013). Aquest fet suggereix que, al llarg de les setmanes en cultiu, les cèl·lules haurien migrat per l'interior de l'àcinus per organitzar-se en funció de les interaccions amb les cèl·lules adjacents.

Per tal d'avaluar el correcte creixement del cultiu cel·lular es va analitzar la seva cinètica de creixement així com la presència de proteïnes indicadores d'estrès cel·lular com p16. Durant les primeres setmanes en cultiu les cèl·lules derivades tant de la donant 1 com de la donant 2 van presentar una aturada en el creixement acompanyada d'una morfologia clarament senescent. En concordança, es va detectar la presència de p16 mitjançant Western blot durant el període previ a l'estasi. Un cop superada aquesta aturada en el creixement, no es va detectar l'expressió de p16 ni tant sols després d'exposar les cèl·lules a radiació ionitzant. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts anteriorment tant per aquest mateix grup com per altres autors durant el cultiu de cèl·lules epitelials mamàries on s'ha observat una forta aturada en el creixement que únicament superen aquelles cèl·lules que presenten la metilació del promotor de p16 (Brenner *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 1998; Huschtscha *et al.*, 1998; Feijoo *et al.*, 2016).

Referent a l'ús de p16 com a marcador indicador de senescència, de forma similar a l'observat en aquesta tesi, Brenner i col·laboradors van descriure el 1998 com l'expressió de p16 per part de cèl·lules epitelials mamàries humanes augmentava durant els passatges 3 i 4 en cultiu però era pràcticament indetectable a partir del passatge 5. En el mateix estudi van demostrar que el silenciament de p16 es devia a la metilació del promotor recuperant l'expressió de p16 després de tractar les cèl·lules amb 5-aza-2'-desoxicitidina, un inhibidor de la metilació del DNA (Brenner *et al.*, 1998). Així doncs, cal tenir en compte que la presència de p16 en el cultiu és transitòria i fugaç. Si bé en els estudis de caracterització del cultiu de BPECs, Weinberg i col·laboradors van utilitzar aquest marcador en extractes proteics extrets abans de l'aturada del creixement (dia 21 en cultiu), potser van fer-ho quan encara no s'havia iniciat la seva expressió (Ince *et al.*, 2007). La segona comprovació que van realitzar va ser l'anàlisi de metilació del promotor de p16 confirmant que efectivament no estava metilat. Ara bé, en el treball no s'especifica quan es va dur a terme aquesta anàlisi podent-se haver realitzat en algun moment previ a l'aturada en el creixement on la inactivació de p16 no s'hauria produït. De tota manera, d'acord amb els resultats anteriorment obtinguts per aquest grup, en un cultiu post-estasi es pot trobar un 40% de cèl·lules amb el promotor de p16 intacte (Feijoo *et al.*, 2016). Per tant, la presència d'una

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

població que no presenti el promotor de p16 metilat no és motiu suficient per argumentar que en el cultiu no s'ha silenciats p16.

Un cop acceptat que el manteniment de les BPECs durant llargs temps en cultiu comportaria inevitablement la inactivació de p16, es va decidir iniciar el procés de transformació experimental un cop passat aquest procés de selecció de les cèl·lules que presentaven p16 silenciats. Es va considerar una estratègia encertada tenint en compte que, tal i com van observar Holst i col·laboradors, el teixit mamari de 7 de 15 pacients sanes (~54%) presentaven cèl·lules epitelials mamàries amb el promotor de p16 metilat, suggerint que probablement una bona part de la població de dones presentava cèl·lules a la mama amb aquest tipus d'alteració (Holst *et al.*, 2003). A més, es tracta d'una alteració que no és exclusiva de la mama. Gonzalez-Zulueta i col·laboradors van observar sis dels 10 pacients amb càncer de colon presentaven silenciament de p16 en cèl·lules sanes de la capa mucosa del colon (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995). Així doncs, si bé l'ús de cèl·lules de cultius post-estasi comporta afegir el silenciament de p16 com una alteració addicional en el model de transformació experimental, aquesta és una alteració que es pot trobar de manera fisiològica en algunes cèl·lules de diferents teixits, inclosa la glàndula mamària sana.

Pel que fa a teixit tumoral, segons un estudi publicat per Geradts i col·laboradors, un 37% del total de tumors analitzats presenten nivells indetectables de p16 destacant una gran variabilitat entre els tumors de diferent origen, sent el càncer de mama un dels tipus on s'observa un percentatge més elevat de silenciament (Geradts *et al.*, 1995). Concretament, Herman i col·laboradors van observar que 5 dels 16 pacients amb càncer de mama analitzats (31%) presentaven metilació del promotor de p16 (Herman *et al.*, 1995). Brenner i col·laboradors van observar una disminució de l'expressió de p16 en 11 de les 23 pacients amb càncer de mama analitzades (48%) (Brenner *et al.*, 1996). Així mateix, 43 dels 87 pacients amb càncer de mama (49%) analitzats per immunohistoquímica per Geradts i Wilson no van presentar una expressió de p16 (Geradts i Wilson, 1996). Indubtablement doncs, el silenciament de p16 és una de les modificacions més freqüentment observades en neoplàsies humanes, especialment en el càncer de mama (Brenner *et al.*, 1998). Per tant, el silenciament de p16 degut al cultiu en un estudi on es pretén estudiar la transformació cel·lular, no suposa un escenari gaire diferent al que es pot trobar en condicions *in vivo*.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

El simple fet de posar en cultiu les cèl·lules provinents de teixit mamari se comporta certs canvis en el seu comportament (Baker i Chen, 2012). Un indicador d'aquestes modificacions són els canvis observats en el perfil d'expressió gènica obtinguts mitjançant el PAM. Les cèl·lules no transduïdes es van classificar com un dels subtipus de càncer de mama, mentre que quan els autors de la metodologia analitzen l'expressió de teixit mamari se, la categoria que rep més puntuació és la Normal. Tanmateix, cal destacar que l'anàlisi PAM no està dissenyada per distingir el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules sanes del de les cèl·lules tumorals i, per tant, segons dos dels propis creadors del PAM, el resultat obtingut no és inesperat (Therese Sørlie i Aleix Prat, comunicació personal).

Un altre paràmetre que evidencia els canvis causats pel cultiu in vitro és la modulació del cariotip al llarg del temps i l'acumulació de cèl·lules amb alteracions numèriques o estructurals (Grigorian *et al.*, 2010). Tot i això, la major part de les cèl·lules no transduïdes van presentar un cariotip normal tant durant els primers dies en cultiu (~90%) com després d'haver superat l'estasi (88% en el cas de la donant 1; 61% en la donant 2).

En conjunt, tot i les dificultats tècniques que suposa el mètode de cultiu, les BPECs derivades del cultiu primari de teixit mamari se semblen apropar-se a les condicions fisiològiques de les cèl·lules del teixit mamari se millor que els models basats en línies cel·lulars establertes, sent un bon punt de partida per estudiar la contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular experimental.

Establiment del model de transformació

Per tal d'establir el model de transformació experimental es van introduir les construccions gèniques *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* al genoma de les BPECs amb la intenció de desregular vies supressores de tumors, prevenir la crisi telomèrica i augmentar la proliferació de les cèl·lules. Cap de les alteracions escollides va ser arbitrària com tampoc ho va ser l'ordre en que es van alterar cadascun dels elements, donat que tenen un paper crucial en la transició progressiva de la cèl·lula sana a la cèl·lula tumoral.

En primer lloc es va induir l'expressió de *Ttag* amb la finalitat d'impedir l'acció antitumoral de les proteïnes p53 i pRb, ja que diversos estudis apunten que la major part de les cèl·lules tumorals presenten mutacions que alteren el correcte funcionament de la via de p53 (Campisi, 2001;

Song *et al.*, 2007; Muller & Vousden, 2013), de pRb (Sherr, 2000; Goodrich, 2006) o totes dues. Aquesta primera alteració va generar un context que va permetre mantenir en cultiu a cèl·lules portadores d'alteracions potencialment oncogèniques. Cal tenir en compte que la successió de divisions continuades en un context amb p16 inactiu desemboca en una situació de disfunció telomèrica amb l'acumulació de reorganitzacions cromosòmiques i aneuploïdies que això provoca. Tot plegat, acabaria impossibilitant l'establiment del model de transformació en donar lloc a catàstrofe mitòtica i/o mort cel·lular. Per aquest motiu la segona alteració introduïda va ser *hTERT* ja que permet aturar l'escurçament telomèric i evitar l'aturada de creixement en cultiu de les cèl·lules parcialment transformades (Bodnar *et al.*, 1998; Ouellette *et al.*, 2000; Stampfer *et al.*, 2001). L'efecte protector de la telomerasa es va comprovar amb sondes telomèriques confirmant la presència de seqüències telomèriques prou llargues als cromosomes de les cèl·lules transfectades.

Per últim, per tal d'obtenir el cultiu plenament transformat que es va utilitzar com a control de la transformació experimental, es va induir l'expressió constitutiva de *HRAS* per tal de mantenir una activa proliferació cel·lular. En condicions normals, els propis mecanismes de control de la cèl·lula detecten la sobre-activació de vies de proliferació provocant una aturada en el creixement (Campisi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 1997); és per aquest motiu que l'activació constitutiva de la via de *HRAS* es va induir després d'inhibir l'acció de p53 i pRb amb *Ttag*. Per confirmar la correcta introducció del gen *HRAS*, es va realitzar una PCR quantitativa que va permetre observar un increment significatiu de l'expressió d'aquest gen d'entre 3 i 5 vegades, així com un augment en la taxa de divisió en comparació amb les cèl·lules control no transduïdes.

Diversos estudis coincideixen a afirmar que mutacions en el gen *RAS* només es troben en aproximadament un 5% dels càncer de mama diagnosticats (Barbacid, 1987; Bos, 1989); fet que hauria afavorit que alguns autors afirmessin que aquest gen no tenia un paper important en la progressió del càncer de mama (Dickson *et al.*, 1991). No obstant això, von Lintig i col·laboradors van observar que els nivells proteics de RAS es poden veure alterats per l'augment d'expressió de receptors de factors de creixement com l'EGFR (de les sigles en anglès de *Epidermal Growth Factor Receptor*) o del receptor ErbB2, ja que ambdues proteïnes són activadores de la via de RAS. En el mateix estudi van observar la sobre-expressió d'aquesta via en 11 de les 20 pacients amb càncer de mama analitzades (von Lintig *et al.*, 2000). Així doncs, en el model control de transformació experimental s'ha incrementat l'expressió de *HRAS*, gen que es troba estranyament

mutat en el càncer de mama, però que comporta canvis a nivells de senyalització cel·lular comuns en la major part dels càncers originats a la mama.

En relació a la tècnica utilitzada per introduir aquestes alteracions, alguns autors han observat dificultats a l'hora d'infectar les cèl·lules epitelials mamàries amb partícules virals (Linden *et al.*, 2008). Un exemple és l'estudi realitzat per McAuley i col·laboradors en què van observar una major protecció davant la infecció viral en aquelles cèl·lules que presenten la glicoproteïna de membrana mucina 1 (MUC1), marcador molecular típic de les cèl·lules epitelials mamàries luminals (McAuley *et al.*, 2007). Tanmateix, en el present treball no es va observar un canvi significatiu en el nombre de cèl·lules amb característiques mioepitelials o luminals en cap dels cultius transduïts amb *Ttag* i *hTERT* o *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*. El manteniment de les proporcions d'un i altre llinatge suggereix que el procés d'infecció no es va dur a terme sobre una part del cultiu, sinó que es va produir en una població cel·lular representativa de tot el cultiu.

Característiques de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*

El creixement de les cèl·lules no es va veure afectat per la transducció amb *Ttag* i *hTERT*. Tanmateix, es va observar que el 50% d'aquestes cèl·lules presentaven reorganitzacions estructurals i numèriques, a causa de la disfunció telomèrica assolida per la falta de p16 i possiblement magnificat per l'efecte de *Ttag*. Aquest augment de les alteracions cromosòmiques probablement va ser, juntament amb l'expressió ectòpica dels gens transduïts, la causa del canvi en el perfil d'expressió gènica observat. En les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, un 58% dels gens analitzats amb el mètode PAM mostraven canvis en els seus nivells d'expressió en comparació amb les cèl·lules no transduïdes. Tenint en compte l'augment significatiu del ROR i el *Proliferation Score* calculats pel PAM en aquelles cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* respecte les no transduïdes, és molt probable que la transducció amb *Ttag* i *hTERT* aportés a aquestes cèl·lules característiques oncogèniques. Aquest fet es va confirmar amb els resultats obtinguts en l'assaig de creixement independent d'ancoratge, en el qual es va observar que les BPEC transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* eren capaces de créixer en suspensió i formar més colònies i de major mida en agar tou que les seves homòlogues no transduïdes. Altres autors han utilitzat aquesta metodologia per estudiar la capacitat tumorigènica de diferents models de transformació (Puck i Marcus, 1956; Steinberg i Pollack, 1979; Bertoncetto *et al.*, 1982; Franken *et al.*, 2006). Un exemple és l'estudi realitzat per Elenbaas i col·laboradors on es descrivia per primera vegada un model de transformació experimental mitjançant *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* en cèl·lules

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

epitelials mamàries humanes (HMECs). En aquest cas, de les 50.000 cèl·lules transduïdes només amb *Ttag* i *hTERT* sembrades en agar tou, únicament 10 van ser capaces de formar colònies (0,02%), donant per negatiu el creixement en suspensió d'aquestes cèl·lules segons la interpretació feta pels propis autors (Elenbaas *et al.*, 2001). Era d'esperar que diferents tipus de cèl·lules epitelials mamàries tinguessin comportaments diferents un cop transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*. Segons Ince i col·laboradors, les BPECs presenten un potencial tumorigènic molt més elevat que les HMECs (Ince *et al.*, 2007). Aquest fet podria explicar perquè, tot i seguir el mateix procediment experimental, l'eficiència de formació de colònies per part de les BPECs transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* observada en aquest treball fos més elevada que l'eficiència de les HMECs en les mateixes condicions.

Tot i les diferències observades entre les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* respecte les cèl·lules no transduïdes, en tots dos casos el cultiu en Matrigel va donar lloc a estructures tridimensionals que presentaven una disposició de les cèl·lules amb característiques mioepitelials i luminals similars als presents a la glàndula mamària en un ~90% dels acini analitzats. Aquest fet indica que, tot i les reorganitzacions cromosòmiques i els canvis en l'expressió gènica observats, les cèl·lules parcialment transformades van mantenir la capacitat de formar acini polaritzats.

En conjunt, l'augment en la proporció de cèl·lules portadores d'anomalies cromosòmiques, el canvi d'expressió gènica i l'increment en la capacitat de formar colònies en agar en comparació a les cèl·lules no transduïdes apunten que les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* han iniciat un procés de transformació, fet que permet distingir-les de les cèl·lules no transduïdes.

Característiques de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*

A diferència de les cèl·lules transduïdes únicament amb *Ttag* i *hTERT*, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* van veure incrementat el seu creixement en cultiu, tal com era d'esperar després d'activar constitutivament la via proliferativa RAS. En conjunt, mentre les cèl·lules no transduïdes requerien 1,78 dies de mitjana ($y=0,562x$) per assolir un *Population doubling*, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* aconseguien duplicar la seva població en tant sols un dia ($y=0,984x$). De forma similar, Serrano i col·laboradors van observar que la micro-injecció del plàsmid que conferia expressió constitutiva de *HRAS* augmentava un 25% el percentatge de

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

cèl·lules en divisió i amb p16 inactivada, en comparació amb les cèl·lules que no presentaven expressió exògena de *HRAS* (Serrano *et al.*, 1995).

La reducció en el temps entre divisions es va veure acompanyada de l'acumulació d'errors en el transcurs de la mitosi que es van poder observar mitjançant les anàlisis citogenètiques. La proporció de cèl·lules amb tetraploidia va passar del ~10% en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* al ~80% en aquelles cèl·lules transduïdes addicionalment amb *HRAS*. Mentre que altres autors que han utilitzat *HRAS* per transformar cèl·lules en cultiu també han observat algunes alteracions citogenètiques derivades de l'expressió d'aquest oncogen (McKenna *et al.*, 1990) (Basolo *et al.*, 1991), no s'han trobat estudis on s'hagi descrit la presència de tetraploidies. En el seu treball, Basolo i col·laboradors, després d'induir l'expressió ectòpica de *HRAS* en les cèl·lules epitelials mamàries humanes immortalitzades MCF10A, van observar alteracions en el cariotip que implicaven la pèrdua o trisomia d'alguns cromosomes, però només el 2% de cèl·lules van resultar tetraploides. Així doncs, tot i que l'augment en l'expressió de *HRAS* va sovint acompanyat de canvis citogenètics, aquests no acostumen a manifestar-se en forma de tetraploidies. Una possible explicació seria que, la inhibició de p53 i pRb afavoriria l'aparició de cèl·lules tetraploides, i l'augment en la proliferació deguda a la transducció amb *HRAS* acceleraria el procés de selecció d'aquestes cèl·lules.

La major part dels tumors humans són aneuploides (Weaver i Cleveland, 2008) i es creu que sovint són originats a partir d'intermediaris tetraploides que han patit pèrdues cromosòmiques (Ganem *et al.*, 2007). Diversos estudis centrats en l'acumulació de cèl·lules tetraploides convergeixen en la hipòtesi de que aquestes cèl·lules són un dels estadis inicials en el procés de transformació (Castillo *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007). Una de les evidències experimentals directes més importants de la relació entre la tetraploidització i el procés de tumorigènesi va ser aportada per Fujiwara i col·laboradors. Aquests investigadors van generar cèl·lules tetraploides mitjançant el bloqueig de la citocinesi en cèl·lules epitelials mamàries de ratolí p53-negatives i van demostrar que únicament aquestes cèl·lules, i no les diploides, tenien capacitat de formar tumors en ratolins immunodeprimits (Fujiwara *et al.*, 2005). Per altra banda, Davoli i de Lange van descriure la tetraploidització de fibroblasts humans (BJ i IMR90) i cèl·lules epitelials mamàries humanes (184B i 48RS) p53-negatives a causa de la crisi telomèrica. Els seus resultats van demostrar com les cèl·lules tetraploides presentaven una major formació de colònies en agar tou i una millor eficiència en la formació de tumors en ratolins immunodeprimits (Davoli i de Lange, 2012). Per

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

entendre els resultats d'aquests treballs cal tenir en compte que l'aneuploidia comporta en general una reducció de la viabilitat i que aquest efecte que es veu tamponat quan els errors de segregació es produeixen en un ambient cel·lular tetraploide (Seton-Rogers, 2017; Sheltzer *et al.*, 2017). Dewhurst i col·laboradors van observar com l'acumulació d'errors en la segregació dels cromosomes provocava la mort o l'arrest del cycle cel·lular a les cèl·lules diploides, mentre que les cèl·lules tetraploides (o quasi-tetraploides) presentaven menys mort i continuaven sent proliferatives (Dewhurst *et al.*, 2014). Aquests resultats van suggerir que la tetraploidia dota a les cèl·lules tumorals precursors d'una major tolerància davant la inestabilitat genòmica facilitant la generació d'aneuploidies i l'evolució cap a un cariotip complex (Rasnick, 2002). En conjunt, els diversos estudis coincideixen en afirmar que l'alta freqüència de cèl·lules tetraploides en els tumors indica que aquest procés és un esdeveniment avantatjós a l'hora d'iniciar la tumorigènesi (Coward i Harding, 2014). Així doncs, el fet que les BPECs transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* presentessin un cariotip majoritàriament tetraploide apunta a que el procés de transformació experimental que es pretenia induir s'estava produint.

Tot i el gran canvi en la dotació cromosòmica que comporta la tetraploidització de les cèl·lules, tant el perfil d'expressió gènica com els paràmetres ROR i *Proliferation Score* obtinguts pel PAM de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* va ser molt similar al de les cèl·lules transduïdes únicament amb *Ttag* i *hTERT*. Tenint en compte que el PAM només quantifica l'expressió dels principals gens implicats en la classificació dels subtipus intrínsecs de càncer de mama, és comprensible que la inducció de l'expressió de *HRAS*, que comporta bàsicament un increment en la capacitat proliferativa, no generi grans canvis en els nivells d'expressió dels gens clau per la classificació del tumor.

El creixement en Matrigel de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* va donar lloc a acini en major o menor nombre i mida en funció de la donant, però en ambdós casos el ~60% dels acini van mantenir la seva polaritat, amb les cèl·lules amb característiques luminals rodejades de cèl·lules amb característiques mioepiteliales. Aquest percentatge, tot i ser inferior al que s'observa a les cèl·lules transduïdes només amb *Ttag* i *hTERT*, no és estadísticament significatiu i, en comparació amb estudis similars, és relativament elevat. Petersen i col·laboradors van caracteritzar els acini formats en cultius en Matrigel per cèl·lules sanes i cèl·lules tumorals. Mentre que els acini formats per cèl·lules de 12 mostres de teixit mamari sa i per dues línies de cèl·lules epiteliales mamàries estaven polaritzats, cap dels acini formats per dues mostres de teixit mamari

tumoral i per 6 línies cel·lulars carcinogèniques van presentar lumen o polaritat (Petersen *et al.*, 1992). Tot i que no es va poder valorar la presència de cavitat central degut a la modificació de l'estructura tridimensional dels acini durant el processat de les mostres per microscòpia confocal, sí que s'esperava una disminució de la polaritat a mesura que les cèl·lules adquirien característiques de cèl·lules tumorals.

En aquest sentit, Bissell i col·laboradors afirmen que, tot i que la major part de les cèl·lules tumorals creixen de forma descontrolada en cultius tridimensionals, una petita porció de línies cel·lulars derivades de càncer de mama poden respondre a l'ambient ric en laminina que genera el cultiu en Matrigel, moderant el seu creixement i arribant a formar estructures polaritzades (Bissell *et al.*, 2002). A diferència dels treballs realitzats per Petersen i Bissell, en el present estudi les cèl·lules analitzades provenien de teixit mamari sa i havien estat transformades experimentalment. És possible que les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS* presentessin un increment en la capacitat tumorigènica, tal com ho demostra el creixement clonal en suspensió, però seguissin sent capaces de respondre al contacte amb la matriu extracel·lular aportada pel Matrigel. Això implicaria que aquestes cèl·lules, que es comportaven de forma molt diferent a les cèl·lules parcialment transformades en cultius 2D, haurien adquirit la capacitat de regular el creixement i una capacitat per polaritzar-se en cultius tridimensionals.

D'igual manera que en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, el canvi més rellevant entre les cèl·lules parcialment transformades i les cèl·lules plenament transformades va ser l'increment significatiu de la capacitat de formar colònies en agar. Cal destacar però que, mentre que en les cèl·lules derivades de la donant 1 la transducció amb *HRAS* va comportar la formació de més del doble de colònies, en les cèl·lules derivades de la donant 2 es va observar el major increment en la mida de les colònies formades. Tot i que s'ha descrit la importància de la quantificació de la mida de les colònies formades en agar tot per valorar la tumorigènesi *in vitro* (Bertoncello *et al.*, 1982), la majoria dels estudis que utilitzen aquesta metodologia únicament quantifiquen les colònies formades per un nombre conegut de cèl·lules (Rafehi *et al.*, 2011; Borowicz *et al.*, 2014). Aquesta metodologia genera dificultats a l'hora d'establir els límits d'allò que és considerat com a *colònia* ja que el nombre de cèl·lules presents a les colònies un cop formades és difícilment discernible. Per altra banda, si es valora l'assaig tenint únicament en compte la mida de les colònies es pot cometre un error acumulatiu degut a canvis en la mida de les cèl·lules que les formen, dificultant la comparativa entre estudis realitzats amb diferents tipus

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

cel·lulars. És per aquest motiu que en el present treball es proposa l'anàlisi conjunta tant del nombre com de la mida de les colònies per valorar la capacitat de les cèl·lules de proliferar en suspensió.

Efecte de la radiació sobre el procés de transformació experimental

Un cop caracteritzat el model de transformació, es va estudiar l'efecte de l'exposició a dosis moderades de radiació ionitzant sobre els diferents cultius. Per fer-ho, es va analitzar el comportament de les cèl·lules no transduïdes i transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* vuit setmanes després d'haver-les irradiat. Les dosis de radiació utilitzades van afectar de forma diferent les BPECs no transduïdes i les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*.

Efecte de la radiació sobre les cèl·lules no transduïdes

En cap cas l'exposició a radiació ionitzant va causar canvis rellevants en el creixement de les cèl·lules no transduïdes al llarg de les 8 setmanes en que van ser monitoritzades. Per tant, el dany generat per les dosis utilitzades no va tenir un impacte suficientment per aturar el creixement del cultiu.

Les cèl·lules de les dues donants van mostrar canvis en els perfils d'expressió gènica completament diferents després d'irradiar-les. Aquest fet es pot atribuir al caràcter aleatori de les mutacions generades en el DNA de les cèl·lules per exposició a radiació ionitzant. En general els canvis d'expressió radioinduits van ser pocs, segurament degut a l'eficient reparació del dany durant les 8 setmanes en cultiu entre la irradiació i l'extracció d'RNA. Tot i això, gran part de les alteracions presents 8 setmanes després de l'exposició a radiació tenien una estreta vinculació amb el procés de transformació; fet que suggereix que les alteracions que havien persistit després de tantes setmanes aportaven alguna avantatge a les cèl·lules portadores.

Si bé la radiació no va afectar de forma notable la proliferació de les cèl·lules no transduïdes en cultius en monocapa, el creixement de les cèl·lules en cultius tridimensionals en Matrigel sí que es va veure afectat. La mesura de la mida dels acini al llarg dels 14 dies en cultiu va revelar que havien tingut una proliferació constant. No obstant això, els acini formats per les cèl·lules no transduïdes exposades a radiació ionitzant van ser menys nombrosos i de menor increment de la mida en comparació als formats per les cèl·lules no irradiades; demostrant així que la radiació havia tingut un efecte directe sobre la mida dels acini. Aquest fet suggereix una major sensibilitat

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

del cultiu en Matrigel a l'hora de detectar canvis en la proliferació de les cèl·lules irradiades en comparació amb els cultius 2D.

Els treballs centrats en l'efecte de la radiació en relació als cultius tridimensionals en Matrigel són escassos. La majoria dels estudis publicats s'han realitzat pocs dies després de l'exposició a radiació i es centren en la diferent resposta dels cultius 2D respecte els cultius 3D; per tant els seus resultats són difícilment comparables amb els del present estudi (Park *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2009; El-Ashmawy *et al.*, 2016). Un exemple és l'estudi realitzat per Sowa i col·laboradors on es va comparar la resposta a la radiació de cèl·lules epitelials mamàries humanes immortalitzades i que presentaven p16 silenciada (184A1) cultivades sobre superfície adherent i les cultivades en cultius tridimensionals en Matrigel. El cultiu de les cèl·lules en Matrigel durant els 10 dies posteriors a la irradiació va mostrar una disminució dosi-depenent del nombre de cèl·lules presents al cultiu (Sowa *et al.*, 2010). Cal destacar que en el treball realitzat per Sowa i col·laboradors les cèl·lules es van irradiar els cultius en 2D o 3D directament, mentre que en el present estudi es van mantenir durant 8 setmanes en cultiu adherent per després estudiar el seu comportament en cultius tridimensionals al llarg de 14 dies.

Tot i la disminució en el nombre i la mida dels acini formats per les cèl·lules irradiades, la polaritat dels acini formats, amb cèl·lules amb característiques luminals al centre i mioepitelials a la perifèria, no es va veure afectada en cap de les dosis testades. Així doncs, l'estudi de l'efecte de la radiació en les BPECs mantingudes en cultiu durant 8 setmanes després de ser exposades a radiació ionitzant va revelar la capacitat de formar estructures polaritzades per part de les cèl·lules no transduïdes inclús després de ser exposades a 2 Gy de rajos γ .

La capacitat de créixer amb independència d'ancoratge es va veure afectada per la radiació rebuda de manera diferent a les cèl·lules derivades d'una i altra donant, apuntant possibles diferències en la seva sensibilitat. Mentre que les BPECs provinents de la donant 1 van manifestar un augment en la capacitat de formar colònies 8 setmanes després d'haver-les exposat a 2 Gy de rajos γ , però no quan s'exposaven a dosis inferiors, les cèl·lules provinents de la donant 2 no van incrementar ni el nombre ni la mida de les colònies formades després d'exposar-les a cap de les dosis de radiació testades, des de 0,25 Gy fins a 2 Gy. Una possible explicació seria que les cèl·lules obtingudes d'una i altra donant presentessin diferències interindividuais pel que fa a la resposta davant la radiació. Així, les cèl·lules derivades de la donant 2 podrien requerir dosis

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

superiors a 2 Gy per incrementar la seva capacitat de créixer amb independència d'ancoratge i manifestar el mateix comportament que adquireixen les cèl·lules de la donant 1 irradiades amb aquesta dosi. En altres estudis, utilitzant tècniques diferents, també s'han observat diferències interindividuals davant la resposta de cèl·lules derivades de diferents pacients exposades a la mateixa dosi de radiació (Andreassen *et al.*, 2002; Barnett *et al.*, 2009; Gürtler *et al.*, 2014). Un clar exemple és el treball realitzat per Borràs i col·laboradors on van comparar la resposta de cèl·lules considerades radiosensibles amb les cèl·lules radioresistents després d'exposar-les a 2 Gy de rajos γ . Els seus resultats van demostrar que les cèl·lules radiosensibles presentaven una major persistència del dany al DNA radioinduit, un increment en el nombre d'elements cromosòmics incomplets amb manca de senyal telomèrica, una reducció de la viabilitat a les 24 i 48h post-irradiació, una pertorbació accentuada del cicle cel·lular i una major i prolongada resposta transcripcional; indicant l'existència de clares diferències en la resposta a la radiació per part de cèl·lules provinents de diferents individus (Borràs-Fresneda *et al.*, 2016). Així doncs, la capacitat de créixer en suspensió de les cèl·lules no transduïdes es va veure alterada per l'exposició a radiació ionitzant de forma diferent en les dues donants analitzades possiblement a causa de diferències interindividuals davant el dany radioinduit.

En conjunt, les cèl·lules no transduïdes d'ambdues donants van ser capaces de reparar el dany generat per la radiació ionitzant i mantenir la seva integritat sense veure alterat el seu comportament. D'altra banda, mentre que el seu creixement en Matrigel es va veure afectat per la radiació, la distribució dels diferents llinatges cel·lulars dins els acini es va mantenir intacte. Finalment l'increment significatiu en la capacitat de créixer en suspensió es va poder observar en les cèl·lules d'una de les dues donants després d'una exposició a 2 Gy de rajos γ . Molt probablement, les cèl·lules de l'altra donant, haurien necessitat dosis més elevades per aconseguir un creixement en suspensió significatiu respecte les cèl·lules no irradiades.

Efecte de la radiació sobre les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*

El creixement en monocapa de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* exposades a diferents dosis de radiació ionitzant no es va veure alterat de forma significativa. A part del lleuger desfasament inicial, el pendent de la recta que reflecteix la taxa proliferativa es va mantenir idèntic en les cèl·lules irradiades respecte el seu control no irradiat durant les 8 setmanes de cultiu. Aquest resultat és coherent amb el silenciament de p16 i la inactivació de les proteïnes

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

p53 i pRb que presenten aquestes cèl·lules donat que la inhibició d'aquests elements permetria a les cèl·lules irradiades seguir proliferant malgrat el dany radioinduit.

L'exposició a les diferents dosis de radiació tampoc va alterar significativament el perfil d'expressió gènica en les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* vuit setmanes després d'irradiar-les. Pocs gens van veure alterat el seu nivell d'expressió a causa de la radiació, comportant uns valors de ROR i *Proliferation Score* similars als de les cèl·lules no irradiades. Donada l'aleatorietat en els gens alterats per la radiació, el reduït nombre de gens analitzats en el PAM i el gran canvi en el perfil d'expressió que ja presentaven les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* abans de ser irradiades respecte les cèl·lules no transduïdes, és comprensible que no s'observés un gran canvi en el perfil d'expressió de les cèl·lules 8 setmanes després d'haver-les irradiat.

L'exposició a la radiació va comportar un augment dosi-depenent en la mida dels acini formats per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, suggerint que l'exposició a radiació ionitzant afavoria la formació d'acini de major mida enlloc de comportar una disminució com en el cas de les cèl·lules no transduïdes. En el cas de les mostres de cèl·lules transduïdes irradiades amb 2 Gy, malgrat no es va observar un increment en la mida dels acini com el que s'observava amb dosis inferiors, si que es va detectar increment en el nombre d'acini respecte les mostres no irradiades. Aquest fet suggereix una disminució de la capacitat migratòria de les cèl·lules exposades a 2 Gy que impossibilitaria la correcta agregació de les cèl·lules durant les etapes més inicials, però que no impediria la seva capacitat proliferativa; donant lloc a més acini que els formats per les cèl·lules no transduïdes però d'una mida similar. Així doncs, en termes generals, la proliferació total de les cèl·lules exposades a 2 Gy no s'hauria vist perjudicada ja que l'augment en el nombre d'acini compensaria la disminució en la seva mida. En aquest sentit, Petersen i col·laboradors van demostrar que una de les característiques més evidents en les cèl·lules tumorals cultivades en Matrigel era l'increment en la mida dels acini formats (Petersen *et al.*, 1992). Per tant, es podria concloure que les BPECs transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* exposades a dosis de radiació ionitzant compreses entre 0,5 i 2 Gy presenten un increment dosi-depenent de la mida dels acini compatible amb l'adquisició de noves característiques tumorigèniques.

Pel que fa a l'efecte de la radiació ionitzant sobre la capacitat de formar estructures polaritzades en Matrigel per part de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, es va observar una clara disminució dosi-depenent del percentatge d'acini que presentaven polarització en aquelles

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

cèl·lules provinents de la donant 1. En primer lloc, donat que la pèrdua de capacitat per formar estructures polaritzades és una característica típica de cèl·lules tumorals, aquest fet confirma l'increment de la susceptibilitat de les cèl·lules parcialment transformades a esdevenir tumorals a causa de l'exposició a radiació ionitzant, ja que cèl·lules de la mateixa donant no transduïdes no havien vist afectada la polaritat dels seus acini a causa de la radiació. En segon lloc, el fet que les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de la donant 2 no manifestessin cap reducció en el percentatge d'acini polaritzats, ni tant sols quan es van exposar a dosis de 2 Gy, confirma les diferències interindividuals davant la radiació entre les dues donants analitzades. Aquests resultats suggereixen que, tal com ja apuntaven els resultats obtinguts per les cèl·lules no transduïdes, les cèl·lules provinents de la donant 2 requeririen dosis majors per manifestar el mateix comportament que les cèl·lules de la donant 1.

Pel que fa a l'assaig de creixement independent d'ancoratge, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de la donant 1 van presentar un increment en el nombre i la mida de les colònies formades en agar després de 8 setmanes d'haver-les exposat a 0,5 i 1 Gy de rajos γ , la irradiació amb 2 Gy no va comportar cap canvi en la capacitat de créixer en suspensió per part de les cèl·lules parcialment transformades. Aquest fet podria ser degut a que, donada la falta de la maquinària necessària per aturar la progressió cel·lular i donar temps a reparar el dany radioinduit, 2 Gy va ser una dosi excessiva que hauria afectat negativament a aquestes cèl·lules impedit que adquirissin una avantatge de creixement en cultius en suspensió. Per altra banda, en el cas de la donant 2, únicament aquelles cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* exposades a 2 Gy de radiació ionitzant van manifestar un increment en el nombre i la mida de les colònies formades en agar, altre cop indicant que les cèl·lules de la donant 2 requerien dosis més elevades per manifestar els mateixos efectes que les cèl·lules de la donant 1.

Augment de la susceptibilitat de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*

Comparant els resultats obtinguts en l'estudi de l'efecte de la radiació sobre les BPECs no transduïdes i les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, es posa de manifest com l'exposició a radiació ionitzant va afectar de manera diferent a les cèl·lules no transduïdes i les que ja havien iniciat un procés de transformació.

L'increment de la mida dels acini formats en Matrigel per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* irradiades en contraposició a la reducció de la mida dels acini formats per les cèl·lules no

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

transduïdes irradiades van indicar una resposta contrària per part d'unes i altres cèl·lules davant el dany radioinduït. Per una banda, les cèl·lules no transduïdes van disminuir el seu creixement mentre les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* que havien iniciat el procés de transformació experimental van veure incrementada la mida dels acini formats un cop irradiats, manifestant la seva susceptibilitat a canvis que desembocarien a la progressió del procés de transformació.

L'increment de la sensibilitat de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* a veure's afectades per la radiació ionitzant també es va posar de manifest en la quantificació d'acini amb una organització polaritzada de les cèl·lules amb característiques luminals i mioepitelials. En el cas de la donant 1, amb una sensibilitat més elevada en comparació a la donant 2 davant l'exposició a radiació, es va observar com les cèl·lules que havien iniciat el procés de transformació veien dràsticament reduït el nombre d'acini polaritzats en comparació amb les cèl·lules de la mateixa donant no transduïdes.

Pel que fa al creixement independent d'ancoratge, l'increment en el nombre i la mida de les colònies formades per part de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de la donant 1 després de 8 setmanes d'haver-les exposat a 0,5 i 1 Gy de rajos γ , va demostrar una major susceptibilitat a incrementar la capacitat de créixer en suspensió respecte les cèl·lules no transduïdes; ja que aquestes últimes van requerir una dosi de 2 Gy per manifestar un augment en la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge. De la mateixa manera, tenint en compte que les cèl·lules no transduïdes de la donant 2 no havien format colònies en agar ni havent-les irradiat amb 2 Gy i que, un cop transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, van formar colònies en agar tou, es va corroborar el fet que aquesta donant va requerir una dosi més elevada per manifestar els efectes que presenta la donant 1. Així doncs, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* van requerir una dosi menor per manifestar un increment en la capacitat de créixer en suspensió.

En conjunt, tot i possibles diferències interindividuals, els resultats obtinguts del cultiu de les cèl·lules no transduïdes i les transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* de dues donants diferents tant en cultius tridimensionals en Matrigel com en suspensió en agar tou, apunten conjuntament a una major susceptibilitat a la transformació radioinduïda de les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* respecte les cèl·lules no transduïdes.

Les cèl·lules parcialment transformades irradiades presenten unes característiques similars a les de les cèl·lules plenament transformades utilitzades com a control positiu de transformació. Més

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

concretament, en el cas del creixement independent d'ancoratge, les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* irradiades van formar colònies que, en algun cas, eren fins i tot de major diàmetre que les formades per les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*. A més, mentre que el percentatge d'acini amb polarització de les cèl·lules plenament transformades es va veure disminuït de forma no significativa, en el cas de les cèl·lules parcialment transformades es va observar una disminució estadísticament significativa del percentatge d'acini polaritzats com a conseqüència a l'exposició a radiació ionitzant. En conjunt, aquests fets suggereixen que l'exposició a radiació no és capaç únicament de completar el procés de transformació que havien iniciat les cèl·lules transduïdes amb *Ttag* i *hTERT*, sinó que aquestes presenten de forma més acusada algunes característiques típiques de les cèl·lules tumorals en comparació a les cèl·lules transduïdes amb *Ttag*, *hTERT* i *HRAS*, considerades el control positiu de transformació.

Amb la intenció d'extrapol·lar els resultats obtinguts in vitro en aquest treball, es proposa l'existència d'una susceptibilitat interindividual a la dosi de radiació durant el procés de transformació cel·lular, essent una de les principals causes el *background* d'alteracions gèniques acumulat per les cèl·lules de l'individu al llarg de la vida. Aquest resultat posen de manifest la necessitat de regular encara més l'exposició a radiació ionitzant d'aquells persones que, pel seu bagatge genètic, podrien presentar una major acumulació de cèl·lules parcialment transformades. Per aquest motiu és important saber l'abast carcinogènic que té la radiació per valorar amb detall quins són els avantatges que aporta el seu ús en aquests casos i si realment superen els possibles inconvenients derivats d'aquesta exposició.

Conclusions

1. El medi WIT i la superfície Primaria permeten obtenir un cultiu de cèl·lules epitelials mamàries heterogeni format tant per cèl·lules que presenten característiques luminals com mioepitelials, però no evita l'aturada en el creixement dependent de p16.
2. La transducció amb *Ttag* i *hTERT* genera un context cel·lular en procés de transformació amb característiques intermèdies entre les cèl·lules sanes i les transformades.
3. Les BPECs de les dues donants analitzades presenten diferents graus de sensibilitat en resposta a la radiació. Aquestes diferències interindividuais es veuen reflectides tant en els cultius tridimensionals en Matrigel com en la formació de colònies en agar tou.
4. Les BPECs no transduïdes presenten un augment en la capacitat de créixer en suspensió després d'exposar-les a una dosi mínima de 2 Gy. No s'ha observat un gran canvi en el perfil d'expressió gènica com tampoc s'ha vist afectada la formació d'acini polaritzats a causa de la l'exposició a radiació ionitzant.
5. Les BPECs transduïdes amb *Ttag* i *hTERT* presenten una major susceptibilitat al dany radioinduït que les hi permet manifestar característiques tumorals a una dosi menor que la requerida per les mateixes cèl·lules abans de ser transduïdes.

Bibliografia

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Ahlbom A, Feychting M, Green A, Kheifets L, Savitz DA, Swerdlow AJ. Epidemiologic Evidence on Mobile Phones and Tumor Risk. *Epidemiology* 2009;**20**:639-652.
- Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005;**24**:7729-7745.
- Aisenberg AC, Finkelstein DM, Doppke KP, Koerner FC, Boivin JF, Willett CG. High risk of breast carcinoma after irradiation of young women with Hodgkin's disease. *Cancer* 1997;**79**:1203-1210.
- Akkiprik M, Peker İ, Özmen T, Amuran GG, Güllüoğlu BM, Kaya H, Özer A. Identification of Differentially Expressed IGFBP5-Related Genes in Breast Cancer Tumor Tissues Using cDNA Microarray Experiments. *Genes (Basel)* 2015;**6**:1201-1214.
- Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Peter W. *Molecular Biology of the Cell. Garland Sci* 2015;
- Amis ES, Butler PF, Applegate KE, Birnbaum SB, Brateman LF, Hevezi JM, Mettler FA, Morin RL, Pentecost MJ, Smith GG, et al. American College of Radiology white paper on radiation dose in medicine. *J Am Coll Radiol* 2007;**4**:272-284.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis - Where and how to look for it? *Radiother Oncol* 2002;**64**:131-140.
- Andrechek ER, Mori S, Rempel RE, Chang JT, Nevins JR. Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development. *Development* 2008;**135**:2403-2413.
- Averill B, Eldredge P. *General Chemistry: Principles, Patterns, and Applications* . 2011; Saylor Foundation.
- B. Steinberg And R. Pollack. Anchorage independence: analysis of factors affecting the growth and clony formation of wild-type and dl 54/59 mutant SV40 transformed lines. *Virology* 1979;**99**:302.
- Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 2012;**125**:3015-3024.
- Barbacid M. ras Genes. *Annu Rev Biochem* 1987;**56**:779-827.
- Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* 1989;**105**:223-235.
- Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, Burnet NG. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:134-142.
- Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A. Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review. *Ann Biomed Eng* 2003;**31**:1017-1030.
- Basolo F, Elliott J, Tait L, Chen XQ, Maloney T, Russo IH, Pauley R, Momiki S, Caamano J, Klein-Szanto AJP, et al. Transformation of Human Breast Epithelial Cells by c-Ha-ras Oncogene. *Mol Carcinog* 1991;**4**:25-35.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995;**57**:289-300.
- Bertoncello I, Bradley TR, Chamley WA, Hodgson GS. The characteristics of an anchorage-independent clonal agar assay for primary explanted bovine granulosa cells. *J Cell Physiol* 1982;**113**:224-230.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Bissell MJ, Bilder D. Polarity determination in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin 1. *Breast Cancer Res* 2003;**5**:117-119.
- Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 2002;**70**:537-546.
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:611-622.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (80-)* 1998;**279**:349-352.
- Boekhorst V Te, Preziosi L, Friedl P. Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2016;**32**:491-526.
- Borowicz S, Scoyk M Van, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA. The Soft Agar Colony Formation Assay. *J Vis Exp* 2014;**e51998**.
- Borràs-Fresneda M, Barquinero J-F, Gomolka M, Hornhardt S, Rössler U, Armengol G, Barrios L. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Sci Rep* 2016;**6**:27043. Nature Publishing Group.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;**49**:4682-4689.
- Botlagunta M, Winnard PT, Raman V. Neoplastic transformation of breast epithelial cells by genotoxic stress. *BMC Cancer* 2010;**10**:343.
- Brenner AJ, Paladugu A, Wang H, Olopade OI, Dreyling MH, Aldaz CM. Preferential loss of expression of p16(INK4a) rather than p19(ARF) in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;**2**:1993-1998.
- Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998;**17**:199-205.
- Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, et al. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:13761-13766.
- Bussard KM, Smith GH. The Mammary Gland Microenvironment Directs Progenitor Cell Fate In Vivo. *Int J Cell Biol* 2011;**2011**:1-11.
- Calaf GM, Hei TK. Establishment of a radiation- and estrogen-induced breast cancer model. *Carcinogenesis* 2000;**21**:769-776.
- Campbell GS, Norman JM. *An Introduction to Environmental Biophysics*. *J Environ Qual* 1998;**6**:. Springer New York: New York, NY.
- Campbell H. A review of studies of breast cancer in human populations excluding endocrine studies. *Proc R Soc Med* 1972;**65**:641-645.
- Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 2001;**36**:607-618.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Campisi J, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**:729-740.
- Cardis E. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: Results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol* 2010;**39**:675-694.
- Cardis E, Sadetzki S. Indications of possible brain-tumour risk in mobile-phone studies: should we be concerned? *Occup Environ Med* 2011;**68**:169-171.
- Carvalho DR, Farage L, Martins BJ, Brum JM, Speck-Martins CE, Pratesi R. Brain MRI and Magnetic Resonance Spectroscopy Findings in Patients with Hyperargininemia. *J Neuroimaging* 2014;**24**:155-160.
- Castell J V., Gómez-Lechón MJ. Liver Cell Culture Techniques. 2009;, p. 35-46.
- Castillo A, Morse HC, Godfrey VL, Naeem R, Justice MJ. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res* 2007;**67**:10138-10147.
- Cho US, Morrone S, Sablina AA, Arroyo JD, Hahn WC, Xu W. Structural Basis of PP2A Inhibition by Small t Antigen. *PLoS Biol* 2007;**5**:e202.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007;**130**:223-233.
- Coward J, Harding A. Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer. *Front Oncol* 2014;**4**:123.
- Dairkee SH, Blayney???Moore CM, Smith HS, Hackett AJ. Concurrent expression of basal and luminal epithelial markers in cultures of normal human breast analyzed using monoclonal antibodies. *Differentiation* 1986;**32**:93-100.
- Dance DR, Christofides S., Maidment ADA., McLean ID., Ng KH. *Diagnostic Radiology Physics: A Handbook for Teachers and Students* . *Diagnostic Radiol Phys A Handb Teach Students* 2014; Vienna: International Atomic Energy Agency: Austria.
- Davoli T, Lange T de. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 2012;**21**:765-776. Elsevier Inc.
- Dewhurst SM, McGranahan N, Burrell RA, Rowan AJ, Grönroos E, Endesfelder D, Joshi T, Mouradov D, Gibbs P, Ward RL, *et al*. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov* 2014;**4**:175-185.
- Dickson RB, Gottardis MM, Merlino GT. Molecular insights into breast cancer from transgenic mouse models. *BioEssays* 1991;**13**:591-596.
- Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010;**18**:884-901. Elsevier Inc.
- Ehrenpreis ED, Roginsky G, Gore RM. Clinical significance of mesenteric panniculitis-like abnormalities on abdominal computerized tomography in patients with malignant neoplasms. *World J Gastroenterol* 2016;**22**:10601-10608.
- El-Ashmawy M, Coquelin M, Luitel K, Batten K, Shay JW, Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A, Ward JF, *et al*. Organotypic culture in three dimensions prevents radiation-induced transformation in human lung epithelial cells. *Sci Rep* 2016;**6**:31669. Nature Publishing Group.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett* 2006;**239**:129-135.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 2001;**15**:50-65.
- Elman M, Slatkine M, Harth Y. The effective treatment of acne vulgaris by a high-intensity, narrow band 405–420 nm light source. *J Cosmet Laser Ther* 2003;**5**:111-117.
- Ethier SP, Mahacek ML, Gullick WJ, Frank TS, Weber BL. Differential isolation of normal luminal mammary epithelial cells and breast cancer cells from primary and metastatic sites using selective media. *Cancer Res* 1993;**53**:627-635.
- Feijoo P, Terradas M, Soler D, Domínguez D, Tusell L, Genescà A. Breast primary epithelial cells that escape p16-dependent stasis enter a telomere-driven crisis state. *Breast Cancer Res* 2016;**18**:7. Breast Cancer Research.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer* 2015;**136**:E359-86.
- Fermi E. Quantum Theory of Radiation. *Rev Mod Phys* 1932;**4**:87-132.
- Finnon P, Kabacik S, MacKay A, Raffy C, A'Hern R, Owen R, Badie C, Yarnold J, Bouffler S. Correlation of in vitro lymphocyte radiosensitivity and gene expression with late normal tissue reactions following curative radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2012;**105**:329-336. Elsevier Ireland Ltd.
- Foster SA, Wong DJ, Barrett MT, Galloway DA. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:1793-1801.
- Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Bree C van. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006;**1**:2315-2319.
- Friedman DL, Whitton J, Leisenring W, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, Donaldson SS, Meadows AT, Robison LL, Neglia JP. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2010;**102**:1083-1095.
- Fujimichi Y, Hamada N. Ionizing irradiation not only inactivates clonogenic potential in primary normal human diploid lens epithelial cells but also stimulates cell proliferation in a subset of this population. *PLoS One* 2014;**9**:
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova E V, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;**437**:1043-1047.
- Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;**17**:157-162.
- Garden BC, Garden JM, Goldberg DJ. Light-based devices in the treatment of cutaneous vascular lesions: An updated review. *J Cosmet Dermatol* 2017;1-7.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Gargani L, Picano E. The risk of cumulative radiation exposure in chest imaging and the advantage of bedside ultrasound. *Crit Ultrasound J* 2015;**7**:4.
- Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008;**26**:317-325.
- Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995;**55**:6006-6011.
- Geradts J, Wilson P a. High frequency of aberrant p16(INK4A) expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 1996;**149**:15-20.
- Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;**12**:581-593. Nature Publishing Group.
- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Tornout JM Van, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;**55**:4531-4535.
- González AB de, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays. *Lancet* 2004;**363**:1910.
- Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006;**25**:5233-5243.
- Grigorian AS, Kruglyakov P V., Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya A V., Kuznetsova T V., Polyntsev DG. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med* 2010;**150**:125-130.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;**140**:883-899. Elsevier Inc.
- Gruppen CG. The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology* 2014;**81**:24-37. Elsevier Inc.
- Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci* 2002;**115**:39-50.
- Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 2006;**127**:679-695.
- Gürtler a, Hauptmann M, Pautz S, Kulka U, Friedl a a, Lehr S, Hornhardt S, Gomolka M. The inter-individual variability outperforms the intra-individual variability of differentially expressed proteins prior and post irradiation in lymphoblastoid cell lines. *Arch Physiol Biochem* 2014;**120**:198-207.
- Hahn WC. immortalization and transformation of human cells. *Mol Cells* 2002;**13**:351-361.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg a S, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg R a. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;**400**:464-468.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol Vitro* 2004;**18**:703-710.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**:57-70.
- Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;**144**:646-674. Elsevier Inc.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec* 1907;**1**:116-128.
- Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 2013;**26**:29-48.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;**55**:4525-4530.
- Hines WC, Su Y, Kuhn I, Polyak K, Bissell MJ. Sorting out the FACS: a devil in the details. *Cell Rep* 2014;**6**:779-781. Elsevier.
- Hoglund, E. Blomquist, J. Carlsson, E. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int J Radiat Biol* 2000;**76**:539-547.
- Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, Chew K, Baylin SB, Herman JG, Tlsty TD. Methylation of p16 INK4a Promoters Occurs in Vivo in Histologically Normal Human Mammary Epithelia Methylation of p16 INK4a Promoters Occurs in Vivo in Histologically Normal Human. *Cancer* 2003;1596-1601.
- Horn J, Vatten L. Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *Int J Womens Health* 2017;**Volume 9**:265-272.
- Howard BA., Gusterson BA. Human breast development. *Semin Cell Dev Biol* 2012;**23**:567-573.
- Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, Clark SJ, Reddel RR. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998;**58**:3508-3512.
- Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE, Iglehart JD, Weinberg RA. Transformation of Different Human Breast Epithelial Cell Types Leads to Distinct Tumor Phenotypes. *Cancer Cell* 2007;**12**:160-170.
- Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer* 2016;**8**:25-42.
- Jesinger RA. Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol* 2014;**17**:3-9. Elsevier.
- Kang KS, Sun W, Nomata K, Morita I, Cruz A, Liu CJ, Trosko JE, Chang CC. Involvement of tyrosine phosphorylation of p185(c-erbB2/neu) in tumorigenicity induced by X-rays and the neu oncogene in human breast epithelial cells. *Mol Carcinog* 1998;**21**:225-233.
- Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011;**30**:127-138. Nature Publishing Group.
- Ke M, Hsu J, Jiang Y, Cheng W, Ju Y. Characterization of hTERT-Immortalized Caprine Mammary Epithelial Cells. *Reprod Domest Anim* 2012;**47**:553-561.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, *et al.* The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 2007;**1**:84-96.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Keymeulen A Van, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, Sharma N, Dekoninck S, Blanpain C. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 2011;**479**:189-193.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res Mutat Res* 2013;**752**:10-24.
- Li X-X, Gao S, Wang P, Zhou X, Li Y, Yu Y, Yan Y, Zhang H, Lv C, Zhou H, *et al*. Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients. *Oncol Lett* 2015;**9**:1207-1212.
- Lilyestrom W, Klein MG, Zhang R, Joachimiak A, Chen XS. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev* 2006;**20**:2373-2382.
- Lin Y-F, Nagasawa H, Peng Y, Chuang EY, Bedford JS. Comparison of several radiation effects in human MCF10A mammary epithelial cells cultured as 2D monolayers or 3D acinar structures in matrigel. *Radiat Res* 2009;**171**:708-715.
- Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 2008;**1**:183-197.
- Lintig FC von, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;**62**:51-62.
- Lobbes MBI, Lalji UC, Nelemans PJ, Houben I, Smidt ML, Heuts E, Vries B de, Wildberger JE, Beets-Tan RG. The quality of tumor size assessment by contrast-enhanced spectral mammography and the benefit of additional breast MRI. *J Cancer* 2015;**6**:144-150.
- Luckey TD. Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Dose-Response* 2006;**4**:dose-response.0.
- Ma H, Hill CK, Bernstein L, Ursin G. Low-dose medical radiation exposure and breast cancer risk in women under age 50 years overall and by estrogen and progesterone receptor status: results from a case-control and a case-case comparison. *Breast Cancer Res Treat* 2008;**109**:77-90.
- Macias H, Hinck L. Mammary Gland Development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013;**1**:533-557.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010;**10**:955-960.
- Martini FH, Bartholomew EF. *Essentials of Anatomy & Physiology*. 2013; Pearson, 2012.
- Matoušková E, Dudorkinová D, Krásná L, Vesely P. Temporal in vitro expansion of the luminal lineage of human mammary epithelial cells achieved with the 3T3 feeder layer technique. *Breast Cancer Res Treat* 2000;**60**:241-249.
- Matt A. Is radiation dangerous? *TedEd* 2016; Available from: <https://ed.ted.com/lessons/is-radiation-dangerous-matt-anticole#review>.
- McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, Florin TH, Hill GR, Korolik V, McGuckin MA. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest* 2007;**117**:2313-2324.
- McDaniel SM, Rumer KK, Biroc SL, Metz RP, Singh M, Porter W, Schedin P. Remodeling of the Mammary Microenvironment after Lactation Promotes Breast Tumor Cell Metastasis. *Am J Pathol* 2006;**168**:608-620.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- McKenna WG, Weiss MC, Bakanauskas VJ, Sandler H, Kelsten ML, Biaglow J, Tuttle SW, Endlich B, Ling CC, Muschel RJ. The role of the H-ras oncogene in radiation resistance and metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;**18**:849-859.
- Mettler FA, Huda W, Yoshizumi TT, Mahesh M. Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine: a catalog. *Radiology* 2008;**248**:254-263.
- Mills SE. *Histology for pathologists*. 2012; embo.
- Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013;**15**:2-8. Nature Publishing Group.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic Cell Survival Assay. *Chemosensitivity* 2005;**110**; p. 021-028. Humana Press: New Jersey.
- Nakano H, Shinohara K. X-ray-induced cell death: apoptosis and necrosis. *Radiat Res* 1994;**140**:1-9.
- Niemantsverdriet M, Goethem M-J van, Bron R, Hogewerf W, Brandenburg S, Langendijk JA, Lujik P van, Coppes RP. High and low LET radiation differentially induce normal tissue damage signals. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;**83**:1291-1297. Elsevier Inc.
- O'Hare MJ, Ormerod MG, Monaghan P, Lane EB, Gusterson BA. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation* 1991;**46**:209-221.
- Oftedal OT. The Mammary Gland and Its Origin During Synapsid Evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;**7**:225-252.
- Olsson H, Jernström H, Alm P, Kreipe H, Ingvar C, Jönsson PE, Rydén S. Proliferation of the breast epithelium in relation to menstrual cycle phase, hormonal use, and reproductive factors. *Breast Cancer Res Treat* 1996;**40**:187-196.
- Oonishi K, Cui X, Hirakawa H, Fujimori A, Kamijo T, Yamada S, Yokosuka O, Kamada T. Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenic survival and DNA repair in human pancreatic cancer stem-like cells. *Radiother Oncol* 2012;**105**:258-265. Elsevier Ireland Ltd.
- Oram SW, Liu XX, Lee T-L, Chan W-Y, Lau Y-FC. TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells. *BMC Cancer* 2006;**6**:154.
- Ouellette MM, Liao M, Herbert B-S, Johnson M, Holt SE, Liss HS, Shay JW, Wright WE. Subsenescent Telomere Lengths in Fibroblasts Immortalized by Limiting Amounts of Telomerase. *J Biol Chem* 2000;**275**:10072-10076.
- Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol* 2011;**54**:91-95.
- Park CC, Henshall-Powell RL, Erickson AC, Talhouk R, Parvin B, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. Ionizing radiation induces heritable disruption of epithelial cell interactions. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:10728-10733.
- Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 2006;**66**:1526-1535.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, *et al*. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol* 2009;**27**:1160-1167.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Péchoix C, Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* 1999;**206**:88-99.
- Perou CM, Parker JS, Marron JS, Nobel A, Bernard PS, Ellis M, Mardis E, Nielsen TO, Cheang M. Gene expression profiles to predict breast cancer outcomes. 2013;**1**:111.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M van de, Jeffrey SS, Rees C a, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen L a, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**:747-752.
- Petersen OW, Høyer PE, Deurs B van. Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res* 1987;**47**:5748-5751.
- Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:9064-9068.
- Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007;**117**:3155-3163.
- Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 2009;**15**:842-844. Nature Publishing Group.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;**5**:5-23. Elsevier B.V.
- Prat A, Pineda E, Adamo B, Galv?n P, Fern?ndez A, Gaba L, D?ez M, Viladot M, Arance A, Mu?oz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* 2015;**24**:S26-S35.
- Puck TT, Marcus PI, Ciciura SJ. CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS IN VITRO: GROWTH CHARACTERISTICS OF COLONIES FROM SINGLE HELA CELLS WITH AND WITHOUT A «FEEDER» LAYER. *J Exp Med* 1956;**103**:273-284.
- Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956;**103**:653-666.
- Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *J Vis Exp* 2011;15-17.
- Ramakrishnan R, Khan SA, Badve S. Morphological Changes in Breast Tissue with Menstrual Cycle. *Mod Pathol* 2002;**15**:1348-1356.
- Rashid OM, Takabe K. Animal models for exploring the pharmacokinetics of breast cancer therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;**11**:221-230.
- Rasnick D. Aneuploidy theory explains tumor formation, the absence of immune surveillance, and the failure of chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;**136**:66-72.
- Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med* 2013;**274**:113-126.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;**322**:1536-1538.
- Rhim J, Jay G, Arnstein P, Price F, Sanford K, Aaronson S. Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. *Science (80-)* 1985;**227**:1250-1252.
- Ring EFJ, Ammer K. Infrared thermal imaging in medicine. *Physiol Meas* 2012;**33**:R33-R46.
- Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ, Visvader JE. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 2014;**506**:322-327. Nature Publishing Group.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Ronckers CM, Doody MM, Lonstein JE, Stovall M, Land CE. Multiple Diagnostic X-rays for Spine Deformities and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;**17**:605-613.
- Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol* 2014;**87**:150-161. Elsevier Inc.
- Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas* 2004;**49**:2-15.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:676-682. Elsevier.
- Seibert JA. X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production. *J Nucl Med Technol* 2004;**32**:139-147.
- Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho R, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science (80-)* 1995;**267**:249-252.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 1997;**88**:593-602.
- Seton-Rogers S. Tumorigenesis: Fitness penalties of aneuploidy. *Nat Rev Cancer* 2017;**17**:142-143. Nature Publishing Group.
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat M-L, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006;**439**:84-88.
- Shaw FL, Harrison H, Spence K, Ablett MP, Simões BM, Farnie G, Clarke RB. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;**17**:111-117.
- Sheltzer JM, Ko JH, Replogle JM, Habibe Burgos NC, Chung ES, Meehl CM, Sayles NM, Passerini V, Storchova Z, Amon A. Single-chromosome Gains Commonly Function as Tumor Suppressors. *Cancer Cell* 2017;**31**:240-255. Elsevier Inc.
- Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;**60**:3689-3695.
- Smirnov DA, Brady L, Halasa K, Morley M, Solomon S, Cheung VG. Genetic variation in radiation-induced cell death. *Genome Res* 2012;**22**:332-339.
- Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001;**52**:190-203.
- Sokol ES, Miller DH, Breggia A, Spencer KC, Arendt LM, Gupta PB. Growth of human breast tissues from patient cells in 3D hydrogel scaffolds. *Breast Cancer Res* 2016;**18**:19. Breast Cancer Research.
- Song H, Hollstein M, Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:573-580.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Rijn M van de, Jeffrey SS, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:10869-10874.
- Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:8418-8423.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cerdón-Cardo C, Lowe SW, Benezra R. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 2007;**11**:9-23.
- Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;**360**:790-800.
- Sowa MB, Chrisler WB, Zens KD, Ashjian EJ, Opresko LK. Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 2010;**687**:78-83. Elsevier B.V.
- Stampfer M, Hallows RC, Hackett AJ. Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* 1980;**16**:415-425.
- Stampfer MR. Isolation and growth of human mammary epithelial cells. *J Tissue Cult Methods* 1985;**9**:107-115.
- Stampfer MR, Bartley JC, Rubin H. Induction of transformation and continuous cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene. *Cell Biol* 1985;**82**:2394-2398.
- Stampfer MR, Garbe J, Levine G, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Yaswen P. Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 2001;**98**:4498-4503.
- Standring S, Anand N, Birch R, Collins P, Crossman AR, Gleeson M, Jawaheer G, Smith AL, Spratt JD, Stringer MD, et al. *Grey's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 2016;
- Stefánsson E. The therapeutic effects of retinal laser treatment and vitrectomy. A theory based on oxygen and vascular physiology. *Acta Ophthalmol Scand* 2001;**79**:435-440.
- Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:791-799.
- Stingl J, Raouf A, Emerman JT, Eaves CJ. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;**10**:49-59.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;**458**:719-724. Nature Publishing Group.
- Sutherland RL, Hall RE, Taylor IW. Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Res* 1983;**43**:3998-4006.
- Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol* 2012;**226**:380-393.
- Taherian-Fard A, Srihari S, Ragan MA. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Brief Bioinform* 2015;**16**:461-474.
- Thomas F, Nesse RM, Gatenby R, Gidoin C, Renaud F, Roche B, Ujvari B. Evolutionary Ecology of Organs: A Missing Link in Cancer Development? *Trends in Cancer* 2016;**2**:409-415. Elsevier Inc.
- Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev* 2015;**23**:90-100. Elsevier B.V.
- Vatansver F, Hamblin MR. Far infrared radiation (FIR): Its biological effects and medical applications. *Photonics Lasers Med* 2012;**1**:255-266.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

- Vélez-Cruz R, Manickavinayaham S, Biswas AK, Clary RW, Premkumar T, Cole F, Johnson DG. RB localizes to DNA double-strand breaks and promotes DNA end resection and homologous recombination through the recruitment of BRG1. *Genes Dev* 2016;**30**:2500-2512.
- Veta M, Pluim JPW, Diest PJ Van, Viergever MA. Breast Cancer Histopathology Image Analysis : A Review. 2014;**61**:1400-1411.
- Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:12871-12876.
- Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Rønnev-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBarge MA, Bissell MJ, Petersen OW. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol* 2007;**177**:87-101.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;**339**:1546-1558.
- Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell C a, Dedhar S, Briand P, Lupu R, Bissell MJ. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:14821-14826.
- Wang H, Lacoche S, Huang L, Xue B, Muthuswamy SK. Rotational motion during three-dimensional morphogenesis of mammary epithelial acini relates to laminin matrix assembly. *Proc Natl Acad Sci* 2013;**110**:163-168.
- Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X, Yang X. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis* 2014a;**6**:829-837.
- Wang Z, Lim EG, Tang Y, Leach M. Medical Applications of Microwave Imaging. *Sci World J* 2014b;**2014**:1-7.
- Weaver BA, Cleveland DW. The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008;**14**:431-433. Elsevier Inc.
- Weigelt B, Bissell MJ. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2008;**18**:311-321.
- Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;**69-70**:42-51.
- Yakymenko I, Sidorik E, Kyrylenko S, Chekhun V. Long-term exposure to microwave radiation provokes cancer growth: evidences from radars and mobile communication systems. *Exp Oncol* 2011;**33**:62-70.
- Zhang X, Wang X, Wu T, Li B, Liu T, Wang R, Liu Q, Liu Z, Gong Y, Shao C. Isoliquinoline induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation. *Sci Rep* 2015;**5**:12579. Nature Publishing Group.
- Zubeldia-Plazaola A, Ametller E, Mancino M, Prats de Puig M, López-Plana A, Guzman F, Vinyals L, Pastor-Arroyo EM, Almendro V, Fuster G, et al. Comparison of methods for the isolation of human breast epithelial and myoepithelial cells. *Front cell Dev Biol* 2015;**3**:32.

Annex

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

Components *Tissue Mix Medium* (TMM)

Medi HMEC suplementat amb:

Polymixina B (10.000 U/ml)

Insulina (20.000 ug/ml)

Penicilina (10.000 U/ml)

Streptomycina (10.000 ug/ml)

Amphotecina B (250 ug/ml)

Components Medi de transport

TMM suplementat amb:

FBS (10%)

Components Medi de digestió (*Tissue Digestum Medium* · TDM)

TMM suplementat amb:

FBS (10%)

Hyaluronidasa 1.500 U/ml)

Colagenasa (1.000 U/ml)

Components Congelació CPM1

WIT suplementat amb:

FBS (15%)

DMSO (10%)

Proves selecció BPEC resistència a la puromicina (març 2015):

Concentració puromicina (ug/ml)	Dia 4	Dia 7
0,2	Cap efecte	Cap efecte
0,4	Cap efecte	Cap efecte
0,6	Cap efecte	Poca mortalitat
0,8	Poca mortalitat	Molta mortalitat
1,0	Molta mortalitat	Molta mortalitat

Taula S9. Efecte de la puromicina al cultiu de BPECs en funció de la concentració.

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

A continuació es descriuen les condicions per cada digestió:

Sall 3 μ L tampó 3 10X

3 μ L BSA 10X

1 μ L Sall

4 μ g pLOX-TERT

H₂O fins a 30 μ L

3h a 37°C

Purificar producte amb QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen)

SpeI 3 μ l tampó 2 10X

3 μ l BSA 10X

1 μ l SpeI

23 μ l de pPLOX-TERT purificat després de la digestió amb Sall

ON a 37°C

SnaBI 4 μ l tampó 4 10X

4 μ l BSA 10X

1 μ l SnaBI

4 μ l pLOX-Ttag

H₂O fins a 40 μ L

2h a 37°C

Purificar producte amb QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen)

Sall 4 μ l tampó 3 10X

4 μ l BSA 10X

1 μ l Sall

32 μ l de pPLOX-Ttag purificat després de la digestió amb SnaBI

2h a 37°C

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

XbaI i XhoI 3 µl de Tampó 2 10x
 3 µl de BSA 10x,
 1 µl XbaI i 1 µl de XhoI
 3 µg pRR cherry
 H₂O fins a 30µL

3h a 37°C, guardar a -20°C

SnaBI i XhoI 3 µl tampó 4 10x
 3 µl BSA 10x
 1 µl XhoI i 1 µl SnaBI
 3 µg pRR eGFP
 H₂O fins 30µL

Digestió de comprovació de la lligació:

BamHI 3 µl de Tampó 3 10X
 3 µl de BSA 10X,
 1 µl BamHI
 8 µl de pRR Cherry-hTERT o 8 µl de pRR Cherry relligat
 H₂O fins a 30µL

2h a 37°C, guardar a -20°C

Hpa I 3 µl de Tampó 4 10X
 3 µl de BSA 10X,
 1 µl HpaI
 8 µl de pRR GFP-SV40 o 8 µl de pRR GFP relligat
 H₂O fins a 30µL

2h a 37°C, guardar a -20°C

SnaBI 3 µl de Tampó 4 10X
 3 µl de BSA 10X,
 1 µl SnaBI

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

4 µl de pRR Cherry-hTERT o 8 µl de pRR Cherry relligat

H₂O fins a 30µL

ON a 37°C

Purificar producte amb QIAquick Gel Extraction Kit (Cat No 28706, Qiagen)

Sall 3 µl de Tampó 3 10X

3 µl de BSA 10X,

1 µl Sall

23 µl de pRR Cherry-hTERT o 8 µl de pRR Cherry relligat

H₂O fins a 30µL

2h a 37°C

Seqüència d'oligonucleòtids utilitzats per amplificar els diferents gens per PCR

Ttag

SV40_FW CCAGAAGAAGCAGAGGAAACTA

SV40_RV CCAAGTACATCCCAAGCAATAAC

hTERT

hTERT_FW CTCCATCCTGAAAGCCAAGAA

hTERT_RV AGTCAGCTTGAGCAGGAATG

GAPDH

gapdh_FW AGCCACATCGCTCAGACAC

gapdh_RV GCCCAATACGACCAATCC

Script macro Fiji/ImageJ

```
// v4.0
```

```
// QUANTIFICACIÓ DE NOMBRE I MIDA DE LES COLÒNIES CRESCUDES EN ANCHORAGE ASSAY
```

```
//
```

```
//Millors respecte v3.2:
```

```
//Elimino el producte de l'Analyse particles que em generava tantes imatges que no guardava.
```

```
//Això redueix el volum d'arxius oberts simultàniament i espero poder analitzar més imatges seguides sense que es bloquegi el programa.
```

```
//Glosari:
```

```
//waitForUser: apareix una finestra emergent que atura la macro fins que apretes OK.
```

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

//getFileList: fa una llista dels arxius que hi hagi al directori anteriorment seleccionat, en el meu cas 'dir1'

//list.length: conta quants arxius hi ha a la llista d'arxius del directori.

//i<list.length: repeteix el loop tantes vegades com arxius tinc a la carpeta. Suposo que es pot posar un nombre fix.

//i++: no tinc ni idea de què fa . :

```
waitForUser(("Tros de llondro! Has guardat els resultats obtinguts en la anàlisi anterior? Si no els guardes es perdran quan premis OK!"));
```

```
waitForUser("Has escalat la imatge? 124px = 200um 2219,35x1674,19um (1376x1038); 16-bit; 2,7MB");
```

```
f= File.open("/Users/joanrepulles/Desktop/Resultados_macro.xls");  
print(f,"Foto" + "\t" + "Area");
```

```
dir1=getDirectory("Carpeta on hi ha NOMES les imatges a analitzar (sense altres arxius!)")  
run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding  
fit shape feret's integrated median skewness kurtosis area_fraction stack limit redirect=None  
decimal=0");
```

//Aquí comença el loop!

```
list1=getFileList(dir1);
```

```
for (i=0; i<list1.length; i++) {  
    imgName=getTitle();
```

```
    MyID=getImageID();  
    selectImage(MyID);  
    run("Duplicate...", "imgName");
```

```
    MyID1=getImageID();  
    selectImage(MyID1);
```

```
    setAutoThreshold("Minimum dark");  
    run("Threshold...");
```

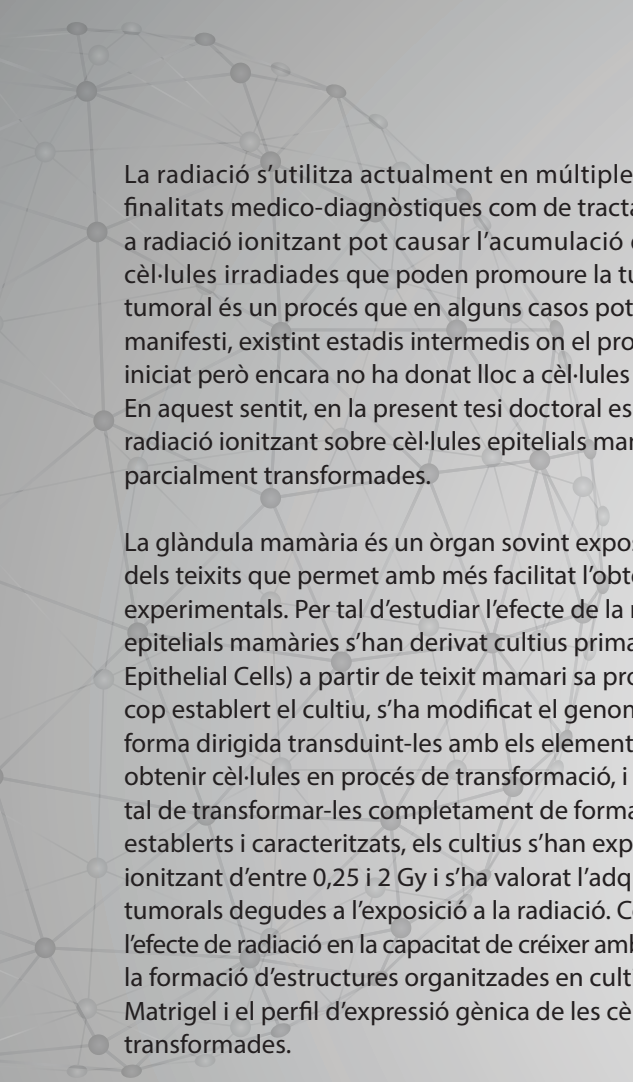
```
    waitForUser("TH");  
    run("Convert to Mask");  
    run("Invert");  
    selectWindow("Threshold");  
    run("Close");
```

```
    run("Analyze Particles...", "size=250-Infinity circularity=0.00-1.00 display exclude clear  
include");
```

```
    if (isOpen("Results")) {  
        selectWindow("Results");  
        for (j=0; j<nResults; j++) {  
            a=imgName;
```

Contribució de la radiació ionitzant en el procés de transformació cel·lular

```
        b=getResultString("Area",j);
        print(f, a+ "\t"+ b);
    }
}
selectImage(MyID);
run("Open Next");
selectImage(MyID1);
run("Close");
selectImage(MyID);
}
File.close(f)
```

La radiació s'utilitza actualment en múltiples procediments tant amb finalitats medico-diagnòstiques com de tractament. Tanmateix, l'exposició a radiació ionitzant pot causar l'acumulació de mutacions al DNA de les cèl·lules irradiades que poden promoure la tumorigènesi. La transformació tumoral és un procés que en alguns casos pot durar dècades abans no es manifesti, existint estadis intermedis on el procés de transformació s'ha iniciat però encara no ha donat lloc a cèl·lules capaces de formar un tumor. En aquest sentit, en la present tesi doctoral es pretén investigar l'efecte de radiació ionitzant sobre cèl·lules epitelials mamàries humanes sanes i parcialment transformades.

La glàndula mamària és un òrgan sovint exposat a radiació ionitzant i un dels teixits que permet amb més facilitat l'obtenció de teixit sa per finalitats experimentals. Per tal d'estudiar l'efecte de la radiació sobre les cèl·lules epitelials mamàries s'han derivat cultius primaris de BPECs (Breast Primary Epithelial Cells) a partir de teixit mamari sa provinent de dues donants. Un cop establert el cultiu, s'ha modificat el genoma d'aquestes cèl·lules de forma dirigida transduint-les amb els elements gènics Ttag i hTERT per obtenir cèl·lules en procés de transformació, i amb Ttag, hTERT i HRAS per tal de transformar-les completament de forma experimental. Un cop establerts i caracteritzats, els cultius s'han exposat a dosis de radiació ionitzant d'entre 0,25 i 2 Gy i s'ha valorat l'adquisició de característiques tumorals degudes a l'exposició a la radiació. Concretament, s'ha estudiat l'efecte de radiació en la capacitat de créixer amb independència d'ancoratge, la formació d'estructures organitzades en cultius tridimensionals en Matrigel i el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules sanes i parcialment transformades.

Les cèl·lules parcialment transformades van presentar un increment de la capacitat de formar colònies en agar 8 setmanes després d'irradiar-les amb 0,5 Gy o 2 Gy, en funció de la donant. En una de les dues donants també es va observar una disminució de la capacitat de formar estructures tridimensionals polaritzades per part de les cèl·lules parcialment transformades i irradiades. En conjunt, els resultats obtinguts han demostrat una resposta amb diferent grau de sensibilitat per part dels cultius derivats de les dues donants analitzades, suggerint possibles diferències interindividuals davant la resposta a la radiació. De manera més important, en les dues donants es va observar una major susceptibilitat davant la transformació radioinduída per part d'aquelles cèl·lules que havien iniciat el procés de transformació de forma experimental, requerint menys dosi que les cèl·lules no transduïdes.