



**AVALUACIÓ PRECLÍNICA DE L'EFECTE  
ANTITUMORAL DE CETUXIMAB SOBRE LA  
MALALTIA MICROSCÒPICA RESIDUAL POST-  
RADIOTERÀPIA**

**Gemma Pueyo Castells**

**2010**



**AVALUACIÓ PRECLÍNICA DE L'EFECTE ANTITUMORAL DE  
CETUXIMAB SOBRE LA MALALTIA MICROSCÒPICA  
RESIDUAL POST-RADIOTERÀPIA**

Memòria presentada per

**Gemma Pueyo Castells**

Per optar al grau de

**Doctora en Biologia Cel·lular**

Tesi realitzada sota la direcció del

Dr. Josep Balart i Serra

A l'Institut Català d'Oncologia i

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

Tesi adscrita al departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
de la Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bienni 2005-2007

Tutor: Dr. Lleonard Barrios Sanromà

Dr. Josep Balart

Dr. Lleonard Barrios

Gemma Pueyo

Bellaterra, 2010



*Als meus avis*

*Als meus pares*

*Al meu germà*



## AGRAÏMENTS

Quan vaig arribar al laboratori pensava que el final de tesi encara quedava molt lluny, massa. Però no sé com, després de 4 anys i mig, em trobo davant de l'ordinador escrivint el punt i final... Cada vegada que penso en tot el que he viscut durant tot aquest temps no puc evitar posar-me melancòlica... i plorar! No sempre ha estat un camí fàcil, però he tingut la gran sort de poder comptar amb tots vosaltres, que heu estat al meu costat i m'heu ajudat a no desistir i a tirar endavant aquest projecte. Gràcies!

La primera persona a qui li he de donar les gràcies és al **Josep Balart**, el meu director de tesi. Durant aquests anys hem viscut moments de tot, d'admiració, de treball en equip, de comprensió, d'efusivitat, d'alegria, de precaució..., tot i que també d'incomprensió i d'incredulitat. Passa a les millors famílies i és el que cal per millorar dia a dia i poder arribar on estem ara. Gràcies per confiar en mi des del principi, per obrir-me les portes del grup RBI i per donar-me l'oportunitat d'endinsar-me en el món de la recerca en càncer.

Encara recordo el primer dia, eren les 8 del matí i tenia un nus a la gola quan vaig entrar per la porta del LRT. El laboratori estava pràcticament desert, i no sabia ni tan sols on deixar les coses. La primera persona que vaig veure va ser la **Yolanda**. Sort de tú, gràcies per fer-me baixar els nervis d'aquell dia amb el teu somriure i la teva manera de fer les coses, sempre tant eficaç. Poc després, ja estava fent un cafè amb alguns dels que serien els meus companys de laboratori. Gràcies **Ari, Josep Maria, Laureta, Maria, David, Àlvaro i Felip** per aquell primer cafè que em va fer sentir una més de vosaltres, sempre m'enrecordaré. A aquell cafè n'hi van seguir d'altres, i sopars, i dinars, i festes, i sortides a la muntanya (gràcies Jm! You knou...), i partits de futbol, i de volley-platja, i tantes i tantes activitats que em feien riure tant i desconnectar de tot. Ho he compartit pràcticament amb tots vosaltres. Per això, gràcies **Marc, Ernest, Dani, Ester, Laia, Helena, Sara, Sònia, Alena, Marta G., Juanjo, Pancha, Miguel, Raúl, Edu, Manel, Ramón, Alberto, Gabi C., Ander, Griselda, Bea, Wilmar, Mercè, Marta P., Maria P., Mar, Gabi, Vane, Marta B., Lara, Sol, Mireia, Clara, Fati, Nadia, Gemma A., Bego, Yessica, Antònia, Marta Pineda, Mireia Morell, Mireia Menéndez, Mireia Gausachs, Olga, Raquel, Susana**.

**Ari i Jm**, em vau adoptar en el vostre grup, i després s'hi va unir el **Marc**, així cap de nosaltres va estar sol. Un grup adoptiu, sí senyor!! Gràcies per les vostres lliçons de molecular, per tots els *brainstorming*, pels ànims quan els experiments no sortien...però sobretot, gràcies

per totes les vegades que m'heu fet plorar de riure i pel vostre recolzament a tots els nivells. Us ho he dit mil vegades i mai em cansaré de repetir-ho, ha costat, però sense vosaltres no ho hagués aconseguit.

Gràcies **Laureta, Maria i Sara** per la vostra predisposició a ajudar sempre i per les xerradetes divertides a la poiata, en les que també tenien molt a veure el **David, l'Àlvaro, el Marc i l'Alberto** (quan no estava a l'estabulari), i a les que us vau unir vosaltres, **Mireia i Clara**. Gràcies **Laieta** per somriure sempre, per les converses alegres i no tant alegres que hem tingut, sobretot aquest últim any, i per compartir amb mí les penes dels *buffers* que s'acaben... Gràcies **Helena i Griselda** per la vostra alegria contagiosa. **Ernest**, un oncòleg amb un gran cor, gràcies per escoltar-me i per preocupar-te cada dia, i per robar-me les pipetes i les caixes de puntes de la poiata! Gràcies a les noies d'angio. **Mar, Vanesa i Gabi**, gràcies per la vostra simpatia. **Agnès**, entre moltes altres coses, ets la reina de les immumos i l'ELISA; gràcies per transmetre'm el teu coneixement i per ser sempre tant optimista. **Wilmar**, mil gràcies per ajudar-me totes les vegades que han fet falta i per fer amb mi el meu primer western. **Bea**, gracias por tu salero sevillano y tu derroche de energía, increíble!. **Marta Páez**, gràcies pels ànims que em donaves per comptar vasos sempre que ens trobàvem a la sala del "zulo-micro" i per les vegades que n'hem sortit rient. **Puigvila**, gràcies per les receptes i la teva ajuda, i a l'igual que la **Mercè**, per tenir un somriure als llavis sempre que us miro! **Francesc i Oriol**, gràcies per dir la vostra en els seminaris i pels vostres ànims. També vull donar les gràcies (encara que sigueu uns acaparadors d'espai...) a tot el grup dels RA/TG. Tots plegats m'heu fet entendre una mica el món dels virus. **Alena** (ara ja ningú balla claqué!), **Manel, Sònia, Juanjo, Jordi, Marta Giménez**, gràcies per ajudar-me des del començament en tot el que estava al vostre abast. **Pancha**, gracias por nuestras charlas i llorar conmigo en esta última fase (ya se acabó!). Al pack **Edu-Miguel-Raúl**, gràcies per fer les coses divertides, per fer-me riure, pels cafès i per la nicotina!. **Fati, Bego, Nadia i Gemma A.**, gràcies per compartir l'espai del lab amb mi en aquesta recta final i per ser companyes de fatigues... i de riures! Gràcies **Olga** per tenir sempre el material a punt. **Natàlia**, gràcies per intentar i fer que el laboratori funcioni millor i per preocupar-te per nosaltres. **Laura B.**, gràcies per les vegades que hem rigut i per les que m'has tranquil·litat. A la **Isa**, que encara que estigui el lab buit sempre comença a netejar per on ets tu!!! Gracias por preocuparte cada día y por hacerme reír la mayor parte de ellos, y como no, por guardarme las placas a las 11 de la noche las veces que ha hecho falta. Estoy segura de que muchos experimentos del lab no se hubieran podido hacer sin ti!.



Naturalment, gràcies a les que són o han estat part del grup RBI. **Sol**, gràcies, gràcies i gràcies per les lliçons tant interessants de medicina, per ajudar-me amb les biòpsies, les cèl·lules i els ratolins quan se'm solapava tot. I com no, pels cafès i marujeos a mig matí i a l'hora de berenar!. **Marta B.**, gràcies per tenir sempre paraules per tothom i per la teva disposició a ajudar. **Lara**, hemos coincidido poquito pero gracias por tu paciencia (que es la madre de la ciencia) i por esas fotos de última hora.

I no em puc oblidar de la meva padrina científica, la **Marga Nadal!** Margaret, gràcies pels dinars, sopars, birres, pitis, *knockandos*... dels que en sortien riures, per la teva alegria i energia (on carregues la bateria?) i per ser tan estupenda. Gràcies per les lliçons de ciència i per ensenyar-me el magnífic món de la citogenètica molecular! Si us plau!!! què seria una tesi sense FISH i CGH!!!??? Mil gràcies pel teu optimisme, per ajudar-me sempre, per donar-me una empenta i per fer-me veure les coses des d'una altra perspectiva quan ha sigut necessari. I un milió de gràcies per mostrar-me que es pot estimar la ciència "a pesar de todo". Ets la millor.

Gràcies a tots aquells amb qui he tingut menys relació però que també heu aportat el vostre granet de sorra, la gent del **LRT2**, de l'**estabulari** (on m'hi he passat tantes hores...) i del **PEBC**. Als **tècnics de radioteràpia**, gràcies per trobar un forat entre els malalts per irradiar les meves cèl·lules i per la paciència amb els 45 Gy.

I com a fora del laboratori també hi ha vida... gràcies a tots els meus amics de sempre. Els anys passen ràpid i no en sóc gaire conscients; quan miro enrere us veig al meu costat, passant-nos-ho bé, rient moltíssim i compartint infinitat de coses. Gràcies per tots els moments que durant la tesi m'han servit per desconnectar de ratolins, cèl·lules irradiades, biòpsies, tumors, experiments... i de tot el que ha comportat. Gràcies per animar-me quan ha fet falta, per deixar que em desfogués en qualsevol moment, per la vostra curiositat vers la meva feina, pels sopars, pels balls de salsa, per les farres...per tantes coses! Gràcies **Anais, Yolán, Sergio, Óscar, Iván, Rubén, Marta, Meri, Zaira...** estic orgullosa de tenir-vos amb mi.

Finalment, vull agrair a la meva família tot el seu suport. Gràcies als meus **tiets i cosí David** pels ànims i per interessar-vos per la tesi. **Tieta (Alba)**, gràcies també per ajudar-me a deixar de banda la tesi amb els viatgets que hem fet! **Carles**, el meu germanet i futur veterinari, no t'ho he dit mai però quan parlem de la tesi em fas recordar com m'agradava la ciència ja quan tenia la teva edat. Gràcies per això i per fer-me venir ganes de continuar

investigant. I sobretot gràcies **papa** i **mama** pel vostre esforç i per donar-me una bona educació i formació. Gràcies pels vostres consells, per confiar sempre en el que he fet i per donar-me ànims i empenta en els moments crucials.

Per acabar, he de donar les gràcies a la persona que ha estat al meu costat a la poiata, a l'ordinador, dinant al menjador, fent una cervesa al bar... a casa... en definitiva, a mi medio limón. **Marc**, ets únic. Gràcies per compartir amb mi aquest camí que hem triat. Gràcies de tot cor per fer-me riure cada dia, per alegrar-me en els dies grisos (i clars també!), per celebrar junts els èxits, per les converses fructuoses (o no) de ciència, per preocupar-te per mi, per obrir-me els ulls, per estar al meu costat... per mil coses que ja saps. Però sobretot, per aguantar el meu humor d'aquests últims mesos, que sé que no ha estat gens fàcil. Per sort ja s'ha acabat, comença una nova i esperada etapa...així que... sortim aquesta nit?

“La ciència sempre s’equivoca. Mai resol un problema sense crear-ne uns altres deu”

*George Bernard Shaw (1856-1950). Dramaturg irlandés.*



# Índex



<b>ÍNDEX.....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>VII</b>
<b>DEFINICIONS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
1. EL CÀNCER	3
1.1. Situació actual	3
1.2. Bases cel·lulars i moleculars del càncer	5
2. RADIOBIOLOGIA	10
2.1. Mecanisme d'acció de les radiacions	10
2.2. Efecte de les radiacions ionitzants a nivell molecular	11
2.3. Efecte de les radiacions ionitzants a nivell cel·lular	12
2.3. Teoria clonal del càncer i unitats formadores de colònies (CFU)	13
2.4. Cèl·lules iniciadores de càncer ( <i>cancer stem cells</i> )	13
2.5. Assaig clonogènic	14
3. RESISTÈNCIA CEL·LULAR A LA RADIOTERÀPIA	16
3.1. Supervivència de cèl·lules tumorals després de la radioteràpia. Malaltia microscòpica residual	16
3.1.2. Mecanismes de resistència a la radioteràpia	16
3.1.2.1. Increment de l'angiogènesi	16
3.1.2.1.1. <i>VEGF com a principal factor proangiogènic</i>	18
3.1.2.2. Adaptació a la hipòxia	19
3.1.2.2.1. <i>HIF-1 com a principal factor de transcripció</i>	20
3.1.2.3. Increment de la reparació de ruptures de doble cadena	21
3.1.2.4. Repoblació accelerada	21
3.2. Dianes biològiques en radioteràpia	21
4. FAMÍLIA DE RECEPTORS ErbB. EGFR	23
4.1. Receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR)	24
4.1.1. Lligands	24
4.1.2. Dimerització	25
4.1.3. Fosforil·lació	25
4.1.4. Vies de senyalització	25
4.1.5. Activació d'EGFR independent de lligand	27
4.1.6. Internalització	28
4.1.6.1. Internalització al nucli	29
4.2. EGFR i el càncer	30
4.3. Paper d'EGFR en radioteràpia. Resistència a la radiació	32
4.3.1. Repoblació accelerada	32

4.3.2. Efecte d'EGFR sobre la radiosensibilitat	33
4.3.3. Translocació d'EGFR al nucli	33
4.4. EGFR com a diana terapèutica	33
4.5.1. Mecanismes d'acció	34
4.5.2. Combinació de cetuximab i radiació. Estudis clínics	36
<b>HIPÒTESI .....</b>	<b>39</b>
<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>47</b>
1. CULTIUS CEL·LULARS	49
1.1. Cèl·lules A431	49
1.2. Condicions de cultius	49
1.3. Procés de tripsinització	49
1.4. Recompte del nombre de cèl·lules	49
1.5. Congelació i descongelació de les cèl·lules	50
1.6. Control de micoplasma en els cultius	51
2. TRACTAMENT DE LES CÈL·LULES <i>IN VITRO</i>	52
2.1. Agents utilitzats	52
2.1.1. Radiació ionitzant	52
2.2. Obtenció i generació de la subpoblació cel·lular supervivent al tractament.	
Concepte de malaltia microscòpica residual	53
2.2.1. Determinació de l'eficiència de clonació (CE) i de la fracció supervivent (SF): assaig clonogènic	54
3. TRACTAMENT <i>IN VIVO</i>	56
3.1. Animals i estabulació	56
3.2. Generació de xenoempelts a partir de la injecció de malaltia microscòpica residual	56
3.2.1. Tractament dels animals	56
3.3. Mesura del creixement tumoral	57
3.4. Obtenció i processat de les mostres tumorals	58
4. ESTUDIS HISTOLÒGICS DE LES MOSTRES TUMORALS	59
4.1. Immunohistoquímica	59
4.1.1. Estudi i quantificació de la densitat vascular (CD31)	60
4.1.2. Estudi i quantificació dels macròfags (F4/80)	60
4.2. Immunofluorescència	61
4.2.1. Estudi i quantificació de la proliferació cel·lular (Ki67)	61
4.2.2. Estudi i quantificació de l'apoptosi cel·lular (caspasa-3)	61



5. ESTUDIS BIOQUÍMICS	63
5.1. Senyalització cel·lular. Estimulació de la MAPK ERK 1/2	63
5.1.1. Tractament dels cultius	63
5.1.2. Western blot	65
5.1.2.1. Extracció de proteïnes	65
5.1.2.2. Quantificació de proteïnes	66
5.1.2.3. Preparació de les mostres	66
5.1.2.4. Electroforesi en gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE)	66
5.1.2.5. Transferència de proteïnes	67
5.1.2.6. Detecció immunològica amb anticossos específics	67
5.2. Secreció de VEGF-A	68
5.2.1. Tractament dels cultius i obtenció de les mostres	68
5.2.2. ELISA	68
6. ESTUDIS D'EXPRESSION GÈNICA	70
6.1. Obtenció de les mostres	70
6.2. Extracció de l'RNA	70
6.3. Quantificació i determinació de la integritat de l'RNA	70
6.4. Retrotranscripció (RT) de l'RNA a cDNA	71
6.5. Disseny dels <i>primers</i>	71
6.6. Amplificació del cDNA per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)	72
6.7. Quantificació de l'expressió gènica	73
6.7.1. Amplificació dels fragments d'interès	73
6.7.2. Clonatge de <i>B2M</i> , <i>GAPDH</i> , <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> , <i>VEGF-A</i> , <i>TGF-<math>\alpha</math></i> i <i>EGFR</i> en un vector pCR4-TOPO	74
6.7.2.1. Lligació	74
6.7.2.2. Transformació	74
6.7.2.3. Extracció del DNA plasmídic	75
6.7.3. Recta patró	75
6.7.4. Quantificació de les mostres	76
7. ESTUDIS CITOGENÈTICS	78
7.1. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH) d' <i>EGFR</i>	78
7.1.1. Obtenció de les mostres i preparació de les extensions	78
7.1.2. Validació de la sonda	79
7.1.3. Marcatge de la sonda	80
7.1.5. Gel de comprovació	81
7.1.6. Precipitació	81
7.1.7. Hibridació	81
7.1.8. Rentats post-hibridació i muntatge	82
7.1.9. Observació i anàlisi de les imatges	82
7.2. Hibridació genòmica comparada (CGH)	82
7.2.1. Obtenció de les mostres	84
7.2.1. Extracció del DNA genòmic	84
7.2.1.2. Quantificació i determinació de la integritat del DNA	85

7.2.2. Marcatge	85
7.2.3. Gel de comprovació	85
7.2.4. Precipitació	86
7.2.5. Hibridació	86
7.2.6. Rentats post-hibridació i muntatge	87
7.2.7. Observació i anàlisi de les imatges	87
<b>RESULTATS .....</b>	<b>91</b>
1. OBTENCIÓ DE LA SUBPOBLACIÓ CEL·LULAR CORRESPONENT A MALALTIA MICROSCÒPICA RESIDUAL (MMR). AVALUACIÓ <i>IN VITRO</i> DE LA SENSIBILITAT A CETUXIMAB	93
1.1. Determinació de l'eficiència de clonació (CE) i fracció supervivent (SF)	94
1.2. Efectes de cetuximab sobre la malaltia microscòpica residual	97
2. AVALUACIÓ <i>IN VIVO</i> DE LA SENSIBILITAT A CETUXIMAB I CARACTERITZACIÓ MICROSCÒPICA DELS XENOEMPELTS	98
2.1. Avaluació de l'activitat antitumoral de cetuximab	99
2.2. Caracterització microscòpica dels xenoempelts	102
2.2.1. Avaluació de l'angiogènesi associada a tumor	103
2.2.2. Avaluació de la proliferació i apoptosi cel·lular	106
2.2.3. Infiltració dels xenoempelts per macròfags	108
3. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA RESPOSTA INDUÏDA PER LA RADIACIÓ IONITZANT	111
3.1. Activació del factor mitogènic ERK 1/2	111
3.2. Inducció de la transcripció d' <i>EGFR</i> , <i>TGF-<math>\alpha</math></i> , <i>VEGF</i> i <i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	113
3.2.1. En la malaltia microscòpica residual	113
3.2.2. En els xenoempelts	115
3.3. Secreció de VEGF	116
3.4. Caracterització genòmica	117
3.4.1. Determinació de l'amplificació del gen d' <i>EGFR</i>	118
3.4.2. Determinació de desequilibris genòmics	119
<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>145</b>

## ABREVIATURES

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer Staging</i>
<b>APS</b>	Persulfat amònic
<b>BrEt</b>	Bromur d'etidi
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina
<b>C225</b>	Cetuximab
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CE</b>	Eficiència de clonació
<b>CFU</b>	Unitats formadores de colònies
<b>CGH</b>	Hibridació genòmica comparada
<b>CSC</b>	<i>Cancer Stem Cell</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>DNA-PK</b>	Proteïna quinasa dependent de DNA
<b>DSB</b>	Ruptures de DNA de cadena doble
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetraacètic
<b>EGF</b>	Factor de creixement epidèrmic
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de creixement epidèrmic
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunoassay</i>
<b>ERK 1/2</b>	Quinasa regulada per senyals extracel·lulars 1/2
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví
<b>FISH</b>	Hibridació in situ fluorescent
<b>GAPDH</b>	Gliceraldèhid-3-fosfat deshidrogenasa
<b>Gy</b>	<i>Gray</i>
<b>HIF</b>	Factor induïble d'hipòxia
<b>KDa</b>	Quilodaltons
<b>mAb</b>	Anticòs monoclonal
<b>MAPK</b>	Proteïna quinasa activada per mitògens
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmHg</b>	Mil·límetre de mercuri
<b>MMR</b>	Malaltia microscòpica residual
<b>mRNA</b>	RNA missatger
<b>MVD</b>	<i>Microvessel density</i>

<b>NHEJR</b>	Reparació no homòloga
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanòmetre
<b>Pb</b>	Parells de bases
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>qRT-PCR</b>	PCR quantitativa a temps real
<b>RI</b>	Radiació ionitzant
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RT-PCR</b>	PCR de retrotranscripció
<b>RTK</b>	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
<b>Rx</b>	Raigs X
<b>SC</b>	<i>Stem Cell</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic
<b>SF</b>	<i>Surviving fraction</i>
<b>SSB</b>	Ruptures de DNA de cadena simple
<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
<b>TGF</b>	Factor de creixement transformant
<b>TKI</b>	Inhibidors de l'activitat tirosina-quinasa
<b>VEGF</b>	Factor de creixement vascular endotelial
<b>μL</b>	Microlitre
<b>μm</b>	Micròmetre
<b>β2M</b>	β-2-microglobulina

## DEFINICIONS

<b>Tractament concomitant</b>	Es diu que un tractament és concomitant quan s'aplica simultàniament al tractament considerat principal. En el camp de la radioteràpia es refereix al tractament oncològic administrat durant el tractament amb radiació.
<b>Tractament adjuvant</b>	Es diu que un tractament és adjuvant quan acompanya, posteriorment, a un tractament previ considerat principal. En el camp de la radioteràpia es refereix al tractament oncològic addicional administrat després del tractament amb radiació.
<b>Control locorregional</b>	La resolució completa i permanent de la malaltia a nivell de la seva localització inicial i dels seus ganglis limfàtics.
<b>Supervivència global</b>	Temps transcorregut fins la mort per qualsevol causa o fins l'últim control en el cas dels pacients vius.
<b>Supervivència lliure de malaltia</b>	Temps transcorregut fins que es produeixi una recurrència de la malaltia en qualsevol localització, o fins la mort relacionada amb el tractament de la malaltia.
<b>Gray (Gy)</b>	Unitat de dosi que mesura l'energia absorbida per la matèria. Un gray (Gy) és equivalent a l'absorció d'un joule d'energia per Kilo de matèria irradiada (J/Kg).



# **Introducció**





## 1. EL CÀNCER

El cos humà està constituït per diferents tipus cel·lulars, que es reproduïxen per divisió cel·lular i s'organitzen en teixits. En condicions normals, les cèl·lules mantenen un fi equilibri entre els senyals de proliferació i de contenció, de manera que la proliferació cel·lular es dona quan és necessària i s'atura quan ja no es requereix. En les cèl·lules tumorals aquest equilibri es veu alterat, es produeix un creixement cel·lular descontrolat i es dona una pèrdua de diferenciació.

La recerca del càncer en el darrer quart de segle l'ha mostrat com una malaltia que comporta canvis successius en el genoma humà. Actualment, són moltes les evidències que assenyalen el procés tumoral com un procés amb múltiples etapes, on cadascuna reflecteix les alteracions genètiques que condueixen la transformació progressiva de les cèl·lules normals a malignes. Tot aquest conjunt d'etapes és necessari per trencar els diferents sistemes de protecció que regulen la proliferació i l'homeòstasi cel·lular, i que implica una gran complexitat degut als diferents sistemes moleculars que hi ha involucrats.

### 1.1. Situació actual

Els diferents tipus de càncer es classifiquen en tres grans categories: els carcinomes, que són d'origen epitelial; els sarcomes, que tenen el seu origen en el teixit conjuntiu; i les leucèmies, que provenen de les cèl·lules hematopoètiques. El 90% dels càncers humans són carcinomes. Aquest percentatge tant elevat és degut al fet que la major part de la proliferació del cos es produeix a nivell dels epitelis i aquests, a més, són els que estan més sotmesos a lesions físiques i químiques que afavoreixen el càncer.

A més del component genètic, l'ambient és un factor molt important a l'hora de determinar la probabilitat de patir un determinat tipus de càncer. Durant molts anys s'han realitzat estudis epidemiològics que han posat de manifest diferents índexs d'incidència en funció de la situació geogràfica. Per exemple, el càncer de còlon, mama i pròstata són més comuns als països desenvolupats que no pas als subdesenvolupats, probablement pels hàbits alimentaris i per la contaminació industrial. En canvi, altres càncers intestinals estan més arrelats al món subdesenvolupat probablement pel tipus de cocció dels aliments. Pel que fa al càncer de pulmó s'observa que la incidència és força semblant arreu del món degut a la

globalització del consum del tabac. En general, la incidència i mortalitat del càncer està incrementant, tot i els recents avenços en el seu tractament (Cancer Facts & Figures 2007).

El càncer és un problema important tant de salut pública com socioeconòmic arreu del món. Una de cada vuit morts al món es deu al càncer i, mundialment és la segona causa de mort en els països econòmicament desenvolupats (després de les malalties del cor) i la tercera en països subdesenvolupats (després de les malalties del cor i diarrees). Els casos de càncer incrementen en els països desenvolupats degut a la disminució de la mortalitat infantil i morts per infeccions i per l'envelliment de la població (Cancer Facts & Figures 2007).

Cada any es diagnostiquen a Europa 2,9 milions de nous casos de càncer, dels quals 1,7 milions de pacients moren com a causa de la malaltia (Ferlay et al., 2007). Una cinquena part del número total de morts per càncer s'atribueix al càncer de pulmó. El càncer colorectal és la segona major causa de morts per càncer (12,2%), seguit pel càncer de mama (7,8%) i el d'estómac (6,9%).

El tractament varia en funció del tipus de càncer i del seu estadiatge. Aquest ve determinat pel grau d'extensió del tumor primari, que depèn de la localització inicial i la disseminació regional o a distància. En l'actualitat l'estadiatge es realitza segons la classificació TNM (Tumor-Nòduls ganglionars-Metàstasi) del Comitè conjunt americà d'estadiatge del càncer (*AJCC, American Joint Committee on Cancer Staging*) i que es revisa periòdicament.

Les principals modalitats de tractament del càncer són la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia. En front de neoplàsies no disseminades, la cirurgia és el tractament d'elecció sempre i quan el creixement locoregional no sigui excessiu. La radioteràpia s'administra sola o en combinació amb la cirurgia i/o quimioteràpia ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)). En els últims anys, s'ha desenvolupat un interès creixent en el desenvolupament de nous agents terapèutics dirigits específicament a molècules implicades en el creixement desmesurat de les cèl·lules tumorals. Aquests agents "biològics" poden oferir solucions alternatives en pacients resistents a la quimioteràpia estàndard. A més, amb un únic mecanisme d'acció i perfils de toxicitat que generalment no es solapen, els nous agents i les teràpies estàndard es poden combinar per tal de potenciar l'eficàcia global del tractament (Vincent T. De Vita et al., 2005).

## 1.2. Bases cel·lulars i moleculars del càncer

Es diu que el càncer té un origen monoclonal perquè prové d'una anomalia que es produeix, inicialment, en una sola cèl·lula. Ara bé, una sola mutació no provoca la transformació maligne sinó que s'estima que calen entre 3 i 7 successos independents a l'atzar, cadascun amb baixa probabilitat, per tal que una cèl·lula normal es transformi en cancerosa. Aquestes mutacions poden aparèixer espontàniament, es poden heretar o bé poden ser promogudes per agents externs com són virus, radiacions i agents químics, els quals a més augmenten la freqüència natural de les mutacions.

Durant l'última dècada s'han proposat dues hipòtesis principals i que són complementàries per a respondre a la pregunta de com es dona el procés de transformació maligne: una primera, situada en un context més cel·lular i formulada per Hanahan i Weinberg (2000); i una segona, en aquest cas en un context més genètic, plantejada per Vogelstein i Kinzler (2004).

Hanahan i Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) van suggerir que la majoria dels càncers són la manifestació de 6 alteracions essencials de la fisiologia cel·lular que, conjuntament, determinen el creixement maligne. Aquestes capacitats adquirides són:

- Autosuficiència en senyals de creixement. Per a que una cèl·lula normal passi d'estar en quiescència a un estat proliferatiu són necessaris senyals de creixement. Aquests es transmeten a l'interior de la cèl·lula mitjançant receptors de membrana als quals s'hi uneixen molècules senyalitzadores (l·ligands) com factors de creixement, components de la matriu extracel·lular i molècules d'adhesió. Cap cèl·lula normal pot proliferar en absència d'aquests senyals estimuladors. En les cèl·lules tumorals es produeix una autosenyalització mitjançant l'alteració de factors de creixement extracel·lulars (adquisició de l'habilitat de sintetitzar els propis factors de creixement creant un *feed-back* positiu o estimulació autocrina, per exemple TGF- $\alpha$ ), l'alteració de transductors de membrana (mutació o sobreexpressió de molts receptors de membrana als que s'uneixen aquests factors de creixement, per exemple EGFR o HER2/neu), o l'alteració dels circuits intracel·lulars que tradueixen els senyals (alteracions estructurals de proteïnes de les cascades de senyalització com SOS-Ras-Raf-MAPK).
- Insensibilitat als senyals inhibidors de creixement. En un teixit normal, existeixen múltiples senyals antiproliferatius que mantenen la quiescència cel·lular i l'homeòstasi

del teixit. Aquests senyals també es transmeten mitjançant receptors de membrana acoblats a circuits de senyalització intracel·lulars. Els senyals inhibidors de creixement poden bloquejar la proliferació per dos mecanismes diferents. En primer lloc, portant les cèl·lules a un estat quiescent (G0) del que poden ressorgir en el moment en què senyals extracel·lulars ho permetin. En segon lloc, les cèl·lules poden ser induïdes a entrar en un estat postmitòtic, relacionat amb l'adquisició de trets associats a una diferenciació específica. Els circuits que permeten respondre a les cèl·lules normals a aquests senyals inhibidors estan relacionats majoritàriament amb el control del cicle cel·lular, concretament amb el pas per G1. Les cèl·lules tumorals han d'evadir aquests senyals per poder proliferar. Un exemple serien les alteracions dels gens involucrats en la via de senyalització de la proteïna del retinoblastoma (pRb), que impliquen la insensibilitat a factors inhibidors del creixement.

- Evasió de l'apoptosi. L'habilitat de les cèl·lules tumorals per expandir-se, o el que és el mateix, d'un tumor per créixer, depèn del balanç entre la taxa de proliferació i la de pèrdua cel·lular. La mort cel·lular programada o apoptosi representa la font principal d'aquesta pèrdua que es dona com a conseqüència de danys cel·lulars. La resistència a l'apoptosi pot ser adquirida a través de diverses estratègies però la més comuna és a través de mutacions al gen p53, un component clau en la detecció de danys en el DNA cel·lular que indueix la cascada efectora apoptòtica.
- Potencial replicatiu il·limitat. Un cop les cèl·lules arriben a un nombre determinat de divisions, aturen el seu creixement per entrar en senescència. Els telòmers estan formats per centenars de repeticions de 6 pb (TTAGGG). Durant cada cicle cel·lular es perden 50-100 pb en la replicació del DNA telomèric. Aquest escurçament dels telòmers durant successius cicles de replicació té un límit i desemboca inevitablement en la mort cel·lular. Pràcticament tots els tumors adquireixen la capacitat de mantenir constant la mida dels seus telòmers aconseguint d'aquesta manera l'estat d'immortalització. La majoria de tumors ho fan mitjançant la sobreexpressió de la telomerasa.
- Manteniment de l'angiogènesi. La formació de nous vasos sanguinis es dona tant en situacions normals com durant el desenvolupament embrionari, cicatrització de ferides o durant el cicle reproductor de la dona. L'oxigen i els nutrients proporcionats per la vasculatura són crucials per la funció cel·lular i la seva supervivència. Com qualsevol

altre teixit els tumors també necessiten aquest aport, per això solen promoure l'angiogènesi alterant la transcripció de certs gens com per exemple el factor de creixement vascular endotelial (*VEGF*), que actua com a senyal iniciador de la formació de vasos sanguinis.

- Invasió de teixits i metastasi. Tard o d'hora en la progressió tumoral algunes cèl·lules escapen del tumor primari, entren al torrent sanguini o limfàtic i envaeixen nous teixits adjacents o distants. La funció de proteïnes relacionades amb l'adhesió cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular com la E-cadherina es perd en la majoria de cèl·lules epitelials en el front d'invasió (epiteli-mesènquima) i en el procés de metastatització. Gens que codifiquen per proteases es sobreexpressen, inhibidors de proteases s'infraexpressen, i formes inactives de proteases s'activen en les cèl·lules tumorals per poder colonitzar els teixits. Els assentaments de cèl·lules a distància és el que es coneix com a metastasi, i és la causa del 90% de les morts per càncer.

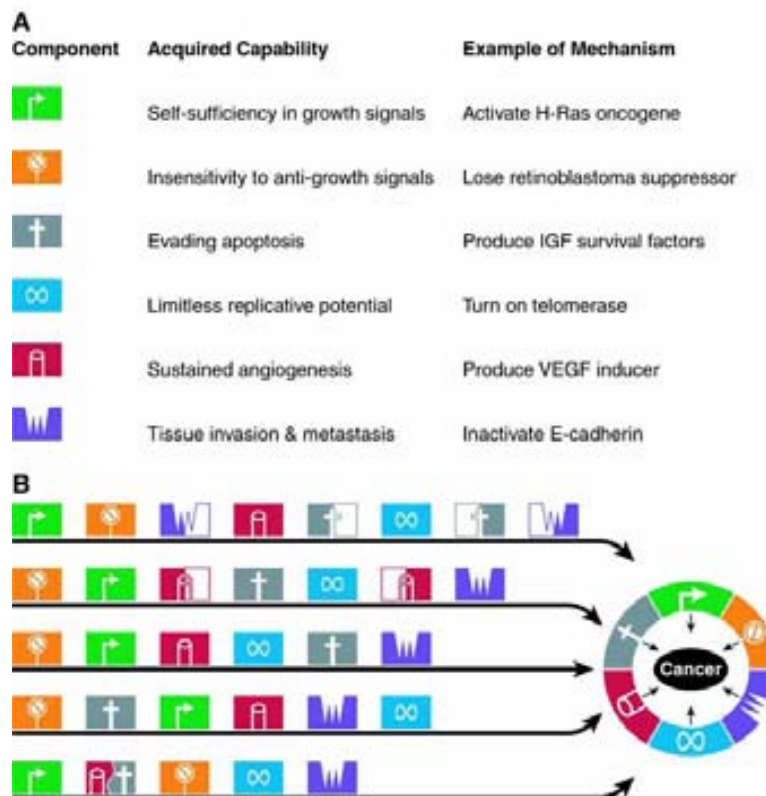
En el segon model, Vogelstein i Kinzler destaquen que, a diferència d'altres malalties genètiques, el càncer no es pot atribuir al defecte d'un sol gen. Els múltiples mecanismes de control presents en mamífers impliquen que només quan s'alteren diferents gens és possible el desenvolupament del càncer. Els autors proposen que hi ha 3 grans grups de gens responsables del procés tumoral:

- Oncogèns. Són gens la funció dels quals acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular ordenada, però també regulen altres funcions clau de la cèl·lula com la supervivència o el grau d'apoptosi. Les mutacions en aquests gens confereixen un guany de funció o una activació constitutiva que donarà lloc a un creixement descontrolat, invasivitat i malignitat de les cèl·lules. Poden ser oncogèns aquells gens que codifiquen per a receptors de membrana amb activitat tirosina-quinasa, membres de vies de transducció de senyals, factors de transcripció o proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular. La mutació en aquests tipus de gens té un efecte dominant, per tant una sola mutació en una de les dues còpies del gen és suficient per provocar dins la cèl·lula un avantatge de creixement. Exemples d'oncogèns són *RAS*, *MYC*, *SRC* i *EGFR*.
- Gens supressors de tumors (GST). La funció principal d'aquests gens és la de controlar la proliferació cel·lular. A diferència dels oncogèns, les mutacions en aquests gens

redueixen l'activitat del seu producte. Els GST són de caràcter recessiu, és a dir, cal la inactivació d'ambdues còpies del gen per a silenciar-los. La majoria d'aquests gens codifiquen per proteïnes de reparació del DNA i control del cicle cel·lular. Alguns dels gens supressors de tumors freqüentment alterats en càncer són els del retinoblastoma (*RB*) i el de la p53 (*TP53*).

- Gens estabilitzadors. La seva funció normal no està relacionada amb funcions de regulació de la proliferació sinó amb el manteniment de la integritat del genoma. La seva mutació implica un increment en l'acumulació de mutacions de la cèl·lula. Per tant, tots els gens poden ser afectats per la mutació d'aquests, però només les mutacions en els dos tipus de gens que s'acaben de mencionar afectaran el balanç net de creixement conferint un avantatge selectiu a les cèl·lules mutades. Normalment, també és necessària la inactivació dels dos al·lels perquè en resulti un efecte fisiològic. Un exemple és *BRCA1*.

Les mutacions d'oncogèns i gens supressors de tumors operen de manera similar a nivell fisiològic: contribueixen al procés tumoral incrementant l'estimulació de la divisió cel·lular, la inhibició de l'apoptosi o eludint els punts de control del cicle cel·lular (Vogelstein and Kinzler, 2004). Per acumular tots aquests defectes i capacitats adquirides es necessita temps, durant el qual els tumors evolucionen a formes més malignes i més agressives. Aquest fenomen es coneix com a progressió tumoral i ja es va definir per Foulds als anys 50, quan va descriure el càncer com un procés a través del qual les cèl·lules evolucionen progressivament des de la normalitat fins a tumors invasius, passant per una sèrie d'estats premalignes (Foulds, 1957; Nowell, 1986; Nowell, 2002). Els processos cap a la malignitat són altament variables. Per exemple, dins d'un mateix tipus de càncer es poden trobar mutacions de certs gens en un nombre determinat dels tumors. A més, mutacions en certs oncogèns poden ser de les primeres alteracions en algunes vies de progressió tumoral i de les últimes en d'altres. Com a conseqüència, l'adquisició de les diferents capacitats biològiques descrites anteriorment pot aparèixer en diferents moments durant les diferents progressions tumorals. Per tant, la seqüència concreta en què les capacitats són adquirides pot variar molt, tant entre tumors d'un mateix tipus com d'origens diferents (Figura 1). En qualsevol cas, independentment de com s'adquireixen aquests canvis, les seves conseqüències biològiques finals són compartides per tots els tipus diferents de càncer (Hanahan and Weinberg, 2000).



**Figura 1. Diversitat en la carcinogènesi.** Exemples de (A) mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del càncer, i (B) de diferents vies de progressió en funció de l'ordre d'adquisició. Extret de Hanahan i Weinberg, 2000.

## 2. RADIOBIOLOGIA

La radiobiologia és la ciència que estudia els fenòmens que es produeixen en un ésser viu com a conseqüència de l'absorció de l'energia procedent de les radiacions ionitzants.

Anomenem radiació a l'energia que es propaga en forma d'ones a través de l'espai. En interaccionar amb la matèria, la radiació perd la seva energia ionitzant, excitant i dissociant les molècules que componen el material travessat. A escala atòmica i molecular són fenòmens que ocorren independentment que la matèria que les absorbeix sigui inert o viva. En l'últim cas, però, les modificacions dels àtoms i molècules que componen la matèria viva tenen importants conseqüències a nivell biològic. Les alteracions en macromolècules com el DNA indueixen canvis en l'estructura i funcionalitat de tot el sistema.

L'absorció de la radiació per part de la matèria viva pot produir excitacions i ionitzacions. L'elevació d'un electró a un nivell superior d'energia dins d'un mateix àtom o molècula és el que anomenem excitació. Quan la radiació té suficient energia per ejeccionar un o més electrons fora de l'àtom es produeix una ionització. Així doncs, parlem de radiació ionitzant (RI) quan hi ha energia suficient per ionitzar els àtoms de la matèria que està atravesant; ho són els raigs X, raigs gamma (ambdues són radiacions no particulars i sense càrrega elèctrica) i els feixos de partícules amb càrrega (electrons, protons, ions) o sense càrrega (neutrons). En canvi, es considera que una radiació és no ionitzant quan només hi ha energia per excitar els electrons, però no per ionitzar-los. Aquest és el cas de la llum i les ones de ràdio (Hall, 2000).

### 2.1. Mecanisme d'acció de les radiacions

Les radiacions ionitzants poden interaccionar amb qualsevol molècula, però la principal diana biològica és el DNA. A més, ho poden fer de manera directa o indirecta.

- Acció directa. La radiació és absorbida directament pel DNA o altres molècules biològiques i els seus àtoms es poden ionitzar o excitar, desencadenant una sèrie d'esdeveniments que condueixen a canvis biològics.
- Acció indirecta. La radiació és absorbida per l'aigua, fet que desencadena la producció de radicals lliures d'oxigen i secundàriament de nitrogen (HO·, NO), espècies



químiques altament reactives, que poden interaccionar amb la molècula de DNA donant lloc a canvis químics que no es poden distingir de l'acció directa (Mikkelsen and Wardman, 2003).

La importància de l'acció sobre el medi resideix en què, degut a que en la cèl·lula hi ha més quantitat d'aigua que de qualsevol altre component, la probabilitat de lesions mediades pel mecanisme d'acció indirecta és major (2/3 del total) que la de lesions directament provocades sobre les molècules clau. A més, la modificació cel·lular radioinduída es pot produir lluny del lloc d'interacció amb la radiació, ja que els radicals lliures poden difondre's en el medi (Hall, 2000).

## **2.2. Efecte de les radiacions ionitzants a nivell molecular**

El dany radioinduït en el DNA és el que té una major transcendència biològica ja que és la molècula encarregada de guardar la informació necessària pel funcionament de les cèl·lules i de transmetre la informació a la descendència.

Els canvis que produeixen les radiacions sobre el DNA són el canvi o la pèrdua d'una base nitrogenada (es produeix principalment per hidroxilació de la timina formant-se dímers d'aquesta base; en alterar-se la seqüència de les bases nitrogenades, la informació genètica es modifica podent donar lloc a una mutació), la ruptura de ponts d'hidrogen entre bases complementàries, les ruptures de simple cadena (SSB) i les ruptures de doble cadena (DSB). Les DSB són les lesions biològicament més rellevants produïdes per la radiació ionitzant que per excel·lència condueixen a la mort cel·lular. Són difícils de reparar correctament, per aquest motiu poden originar mutacions de base, delecions i translocacions cromosòmiques (Hall, 2000).

A banda del dany en el DNA, la radiació ionitzant també pot induir importants respostes biològiques sobre altres components cel·lulars com proteïnes (per exemple receptors transmembrana) o lípids (per exemple ceramides). La radiació ionitzant pot induir una hidròlisi ràpida de l'esfingomielina present en la membrana plasmàtica per a donar lloc a la ceramida, un inductor de l'apoptosi (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kolesnick and Fuks, 2003; Watters, 1999). D'altra banda la radiació també pot estimular receptors amb activitat tirosina-quinasa, com per exemple el receptor del factor epidèrmic de creixement amb una eficiència similar a concentracions fisiològiques d'EGF (Baselga and Arteaga, 2005; Schmidt-Ullrich et al., 1997). Estudis recents proporcionen evidències que la producció radioinduída de

radicals lliures juguen un paper important en l'activació d'EGFR i l'activació de la via de senyalització MAPK (Mikkelsen and Wardman, 2003). A més, també es pot donar una inducció en la secreció de TGF- $\alpha$  per part de les cèl·lules irradiades (Dent et al., 1999; Toulany et al., 2005b).

### 2.3. Efecte de les radiacions ionitzants a nivell cel·lular

El dany biològic esdevé per les lesions produïdes sobre les macromolècules, especialment el DNA. La combinació dels processos desencadenats per la radiació en interaccionar amb el material genètic, les proteïnes i altres components de la cèl·lula donen lloc a la resposta global d'aquesta.

A la major o menor afectació cel·lular per la radiació s'anomena radiosensibilitat. Aquesta és molt variable en funció del tipus cel·lular i les característiques de la radiació (com per exemple la taxa de dosi i l'eficàcia biològica de la radiació). La radiosensibilitat depèn del tipus cel·lular i està fortament relacionada amb l'activitat mitòtica. Tot i això, la resposta a la radiació per un determinat tipus de cèl·lula es pot veure modificada per factors químics, com la presència de compostos radiosensibilitzadors i radioprotectors, o factors biològics, com la fase del cicle cel·lular i l'eficàcia dels mecanismes de reparació. El dany en el DNA no reparat pot donar lloc a aberracions cromosòmiques que poden causar la mort cel·lular o induir o promocionar la carcinogènesi. Tot i l'elevada probabilitat de patir modificacions en el genoma, durant l'evolució s'han adquirit mecanismes que mantenen la integració genètica, tant estructural com informativa, per garantir la vida i la continuació de l'espècie (Hall, 2000).

Deixant de banda la carcinogènesi radioinduïda, la radiació pot tenir diferents efectes cel·lulars originats a partir del dany en el DNA:

- Retràs mitòtic. Correspon a una sincronització del cicle aturant momentàniament les cèl·lules en les fases menys sensibles del cicle. El mecanisme que dona lloc a aquest fenomen és un alentiment de la síntesi de DNA que permet l'actuació de la maquinària de detecció i reparació de danys.
- Mort en interfase. És una mort cel·lular que es dona abans que la cèl·lula entri en mitosi. Està relacionada amb una disminució en la capacitat de producció d'energia per part dels mitocondris i amb les lesions greus de les membranes plasmàtiques. El resultat és la lisi o ruptura cel·lular.

- Fracàs reproductiu. Consisteix en la pèrdua de viabilitat cel·lular, o el que és el mateix, la cèl·lula perd la seva capacitat per a dividir-se repetidament, morint després de poques divisions. A efectes radiobiològics, les cèl·lules no viables són considerades com cèl·lules mortes.
- Necrosi. És un tipus de mort cel·lular que depèn de factors externs a la cèl·lula. Com a resultat d'un dany greu, la cèl·lula perd la seva integritat estructural de manera descontrolada. Es produeix una desorganització i ruptura d'òrgans i un augment del volum cel·lular que provoca la ruptura de la membrana plasmàtica. Les restes cel·lulars que se'n deriven inicien una resposta inflamatòria.
- Apoptosi. És un tipus de mort cel·lular programada que depèn de factors cel·lulars interns. Es caracteritza per una contracció de la cèl·lula, arrugament de la membrana, condensació del nucli i autodigestió del genoma. Les restes que se'n deriven són reconegudes i absorbides per les cèl·lules del seu entorn, per tant, no generen resposta inflamatòria.

### 2.3. Teoria clonal del càncer i unitats formadores de colònies (CFU)

Es considera que el càncer és la conseqüència de l'expansió incontrolada d'una estirp cel·lular. Per definició, tota cèl·lula clonogènica és potencialment una CFU ja que, mitjançant successives mitosis, podrà generar una família de cèl·lules o colònia. Una de les àrees d'interès de la radiobiologia és l'estudi de la mort cel·lular entesa com la pèrdua de la capacitat reproductiva d'una CFU, ja que la curació del càncer depèn de la inactivació de les CFU tumorals.

### 2.4. Cèl·lules iniciadores de càncer (*cancer stem cells*)

Alguns autors han anomenat a les cèl·lules clonogèniques *cancer stem cells* (CSC) o cèl·lules iniciadores de tumors. Estrictament, són les cèl·lules presents en el tumor que tenen la capacitat d'autorenovar-se i de generar llinatges heterogenis de cèl·lules que componen el tumor. En el nostre context, la definició es trasllada a aquelles cèl·lules que, després d'un tractament radioteràpic, tenen la capacitat de generar una recurrència del tumor.

Les *stem cells* estan presents en els teixits i són importants en l'establiment de la fisiologia d'aquests. Les poblacions de cèl·lules que en deriven s'organitzen jeràrquicament, essent la *stem cell* l'àpex de la via de desenvolupament. Aquestes cèl·lules tenen 3

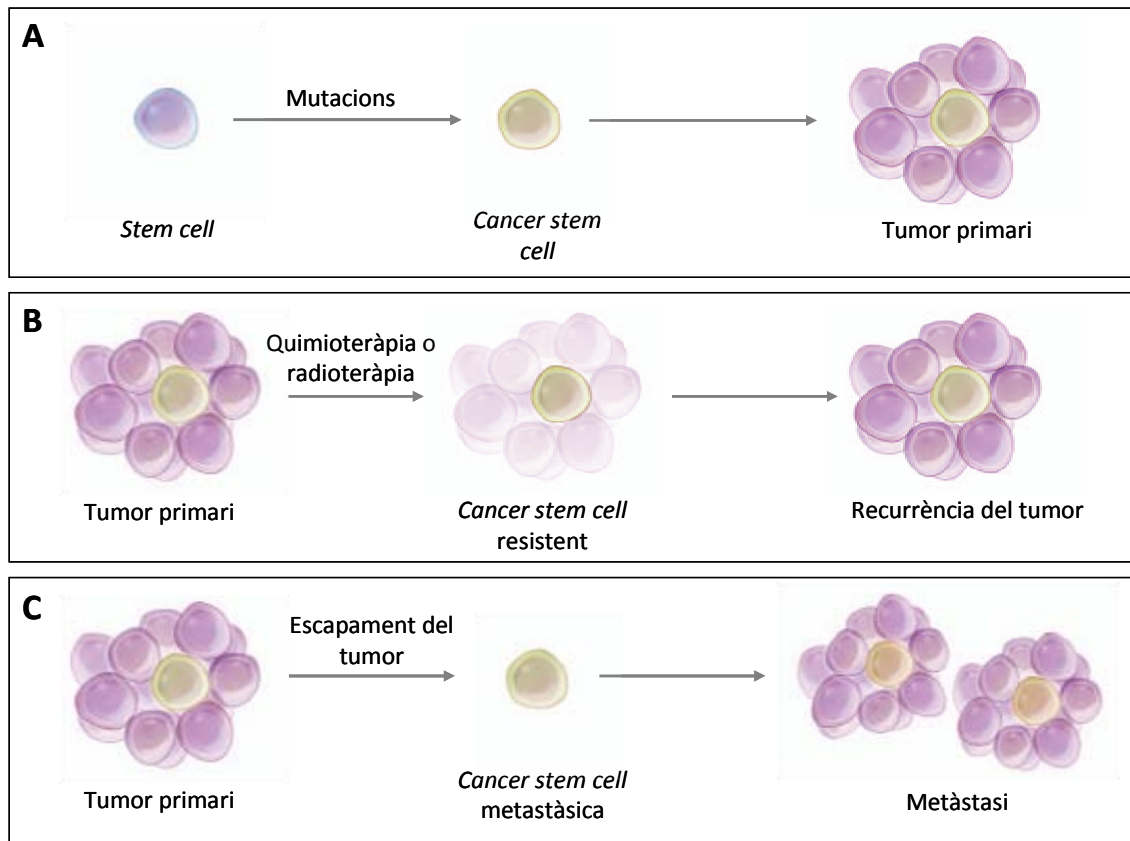
característiques distintives: l'autorenovació, la capacitat de generar llinatges heterogenis de cèl·lules i el potencial de proliferar il·limitadament (Adams and Strasser, 2008; Malumbres and Barbacid, 2009; Rich, 2007).

Les CSC es poden originar a partir de mutacions en les *stem cells*. A més, diferents evidències indiquen que també podrien provenir de cèl·lules progenitores mutades. Aquestes progenitores, també conegudes com cèl·lules amplificadores en trànsit, poden posseir una important habilitat replicativa però sense la capacitat d'autorenovar-se. Per a esdevenir una CSC, s'han de donar una sèrie de mutacions en la cèl·lula progenitora que li confereixi la propietat d'autorenovar-se. Pel que es refereix a la biologia tumoral, les CSC representen una petita fracció de la totalitat de les cèl·lules neoplàsiques, però són determinants de l'evolució de la malaltia oncològica (Jordan et al., 2006). De les propietats aberrants de les CSC d'un tumor primari en depèn la capacitat de disseminació a distància, la resistència a tractaments i el risc de recaiguda després d'un tractament (Baumann et al., 2008; Eyler and Rich, 2008) (Figura 2). Cada cop és més evident que els tractaments oncològics que no són capaços d'eliminar les CSC provoquen un recreixement del tumor degut a la major agressivitat de les cèl·lules supervivents en veure augmentada la seva capacitat angiogènica, la seva taxa de proliferació, l'eficiència en la reparació de DSB radioinduïdes i l'adaptació a la hipòxia (Abbott, 2006; Keith and Simon, 2007; Phillips et al., 2006). Les estratègies terapèutiques que es dirigeixen específicament contra les CSC haurien d'eradicar els tumors amb més eficàcia que els tractaments actuals i reduir el risc de recaigudes i metàstasi (Jordan et al., 2006).

## 2.5. Assaig clonogènic

L'assaig clonogènic és un mètode experimental *in vitro* que s'utilitza per a mesurar la sensibilitat cel·lular d'un agent citotòxic. Consisteix en determinar en quina proporció disminueix la capacitat clonogènica d'una població cel·lular després d'una exposició a l'agent. Les cèl·lules que són capaces de formar colònies després d'un tractament es denominen cèl·lules supervivents (conserven la seva integritat reproductiva) i la proporció de cèl·lules supervivents s'anomena fracció supervivent. D'altra banda, l'assaig clonogènic és una aproximació prèvia als transplantaments ortotòpics en ratolins per a determinar la presència de CSC, i representa una lectura de l'activitat de les cèl·lules progenitores basada en el seu potencial replicatiu diferencial (Adams and Strasser, 2008).

És la tècnica més utilitzada per a determinar la radiosensibilitat cel·lular ja que és un mètode simple, ràpid i reproduïble (Puck et al., 1956).



**Figura 2. Escenaris en els que estan involucrades les *cancer stem cell* (CSC).** (A) La mutació d'una *stem cell* o cèl·lula progenitora pot originar una CSC que generarà un tumor primari. (B) Durant un tractament amb radioteràpia o quimioteràpia la majoria de cèl·lules del tumor primari es destrueixen, però si les CSC no són eradicades, el tumor pot créixer i originar una recaiguda. (C) Les CSC poden escapar del tumor i originar lesions metastàsiques. Extret de Craig. T Jordan, 2009.

### 3. RESISTÈNCIA CEL·LULAR A LA RADIOTERÀPIA

La radioteràpia està involucrada en la curació d'aproximadament un 50% de càncers i pot ser administrada sola o en combinació amb la cirurgia i/o la quimioteràpia (Baumann, 2006). Tot i els considerables avanços tècnics en el tractament radioterapèutic, els resultats no conviden a l'optimisme en alguns tipus de tumors com els de pulmó, cap i coll i cervell, on l'aparició de recurrències locals és la principal causa de mort en aquests malalts. És per aquest motiu que des de la dècada dels 70 s'estan desenvolupant estratègies per a millorar tant el control locorregional com la supervivència global del malalt; entre aquestes s'inclouen la radiació fraccionada, la combinació amb la quimioteràpia i l'ús de dianes biològiques (Zips et al., 2008).

#### 3.1. Supervivència de cèl·lules tumorals després de la radioteràpia. Malaltia microscòpica residual

El principal objectiu de la radioteràpia curativa és eliminar totes les cèl·lules tumorals clonogèniques o *cancer stem cells*. Es considera que després d'assolir una remissió completa pot quedar un remanent de cèl·lules clonogèniques inapreciable en el llit tumoral. Aquestes cèl·lules, també anomenades malaltia microscòpica residual o malaltia mínima residual (MMR, terminologia que hem aplicat en aquesta tesi), representen una petita subpoblació de cèl·lules tumorals que poden originar una recurrència en sobreviure al tractament. Que un tumor pugui ser eradicat per la radiació ionitzant depèn en gran part del número i de la radiosensibilitat de les cèl·lules tumorals. De manera intuïtiva, la dosi total de radiació és el paràmetre més important per a millorar el control local del tumor. Desafortunadament, en moltes situacions clíniques, la toxicitat generada en els teixits adjacents no tumorals impedeix l'administració de les dosis necessàries per eliminar totes les cèl·lules clonogèniques (Krause et al., 2006; Zips et al., 2008).

#### 3.1.2. Mecanismes de resistència a la radioteràpia

##### 3.1.2.1. Increment de l'angiogènesi

Es defineix com angiogènesi la formació de nous vasos sanguinis a partir de la vasculatura ja existent. Aquest és un procés complex que involucra diferents cèl·lules, components solubles i factors de la matriu extracel·lular, i té una gran importància en una gran varietat de processos fisiològics i patològics de l'organisme. L'angiogènesi fisiològica és fonamental durant el desenvolupament embrionari, però també durant el cicle reproductiu femení i en la cicatrització de ferides. Són processos on els teixits necessiten la formació de

nous vasos sanguinis que aportin els nutrients i oxigen necessaris, a la vegada que retiren els productes del catabolisme. En canvi, un desequilibri entre els factors reguladors d'aquest procés dona lloc a l'angiogènesi patològica que acompanya l'aparició de malalties, ja sigui per una insuficiència o un excés d'angiogènesi, com en el cas del càncer (Folkman, 2007). Així, els tumors primaris i les metàstasis no superen un volum de 1-2 mm<sup>3</sup> sense tenir subministrament sanguini propi (Folkman, 1992). Per tant, i segons la hipòtesi de Folkman, els nous vasos creats en un tumor són essencials per a la seva expansió ja que a mida que augmenta el volum del tumor, aquest necessita un correcte aport d'oxigen i nutrients (Hanahan and Folkman, 1996). Aquest procés implica una interacció entre el tumor i les cèl·lules que l'acompanyen, com les cèl·lules endotelials, murals (pericits i cèl·lules de la musculatura llisa), fibroblastes i macròfags associats al tumor. El procés d'angiogènesi consta de 3 etapes (Conway et al., 2001):

1. Inducció-iniciació. Les cèl·lules tumorals i les cèl·lules de l'estroma reclutades secreten inductors angiogènics (factors de creixement i citoquines) per atraure les cèl·lules endotelials i aquestes, a la vegada, produeixen factors de creixement per al tumor (interacció heterotípica). L'equilibri entre inductors i inhibidors de la nova vascularització és tant delicat com important, ja que exerceix el control absolut entre tot el procés d'angiogènesi: mentre les cèl·lules normals secreten quantitats baixes d'inductors i quantitats altes d'inhibidors, a mesura que progressen cap a la malignitat, les cèl·lules tumorals inclinen aquest equilibri cap al fenotip angiogènic, fenomen conegut com *angiogenic switch*. El provoquen diversos senyals com l'estrés metabòlic (hipòxia), l'estrés mecànic (pressió generada per les cèl·lules proliferatives), la resposta immune-inflamatòria (infiltració de cèl·lules del sistema immunitari en un teixit) i les mutacions genètiques (activació d'oncogenes o inactivació de supressors de tumors que controlen la producció de reguladors de l'angiogènesi). En general en aquesta fase d'iniciació es produeix una vasodilatació i un increment de la permeabilitat vascular dels vasos preexistents.
2. Progressió de les cèl·lules vasculars i invasió de la massa tumoral. La proliferació induïda pels factors de creixement, així com la sobreexpressió d'enzims que degraden la matriu extracel·lular, permeten les cèl·lules endotelials posar en marxa processos d'adhesió i migració a través de l'estroma, facilitant la invasió de la massa tumoral.
3. Maduració-remodelació. En un procés angiogènic normal, es produeix una parada en la proliferació, es forma l'estructura tubular i el lumen dels vasos, es desenvolupa la

làmina basal i la matriu extracel·lular i el nou vas recluta cèl·lules murals i fibroblasts, donant lloc a una estructura madura. Així mateix, es produeix una diferenciació de les cèl·lules endotelials i es conforma la morfologia òptima de la xarxa vascular per remodelació de les ramificacions, de manera que el flux sanguini arriba en la mesura necessària a cada punt del teixit. En el cas de l'angiogènesi tumoral, en canvi, hi ha un desequilibri de reguladors angiogènics i la maduració és incompleta. Com a conseqüència es forma una vasculatura excessivament permeable, immadura i funcionalment deficient.

#### 3.1.2.1.1. VEGF com a principal factor proangiogènic

Com ja hem comentat anteriorment, l'angiogènesi és un procés complex estrictament controlat per un balanç entre factors proangiogènics i antiangiogènics.

El factor de creixement vascular endotelial (VEGF) és un mitògen i factor de supervivència de cèl·lules endotelials i un promotor de permeabilitat vascular. Degut a aquestes propietats, actua com a potent inductor de l'angiogènesi. S'han descrit 6 membres de la seva família: VEGF-A, B, C, D, E i PlGF. El principal inductor de l'angiogènesi és VEGF-A, i comunament es coneix com a VEGF (també en aquest treball). S'expressa en molts tipus de tumors humans, i una elevada expressió s'ha associat a mal pronòstic. L'increment de la seva expressió pot donar-se en resposta a diversos estímuls com la hipòxia, el pH, citoquines, factors de creixement i hormones sexuals. L'activació d'alguns oncògens o la inactivació de gens supressors de tumors també poden incrementar els seus nivells (Kerbel and Folkman, 2002).

El VEGF contribueix a la vasodilatació inicial, augmenta la permeabilitat vascular, estimula la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials i disminueix la seva apoptosi. La seva secreció associada a la progressió tumoral és un paradigma d'interacció entre cèl·lules tumorals i estroma. Les cèl·lules tumorals produeixen VEGF i són les cèl·lules endotelials les que expressen el receptor en la seva superfície cel·lular (mecanisme paracrí). Tot i això, en alguns casos pot actuar de manera autocrina (estimulant directament la progressió neoplàsica) ja que determinades cèl·lules tumorals, a més de produir VEGF, expressen els seus receptors (Kerbel, 2008).



### 3.1.2.2. Adaptació a la hipòxia

L'oxigen és una molècula essencial per a la supervivència, i la seva carència és incompatible amb la vida. Actua com a substrat final acceptor d'electrons en la cadena respiratòria mitocondrial, fent possible la síntesi d'adenosina trifosfat (ATP) per fosforilació oxidativa. Per tant, els descensos en la concentració intracel·lular d'oxigen poden causar danys cel·lulars irreversibles.

La hipòxia, o disminució de la pressió parcial d'oxigen, és un fenomen poc habitual en els teixits normals, però apareix amb freqüència durant el desenvolupament tumoral. Tot i l'angiogènesi (sovint aberrant), l'augment progressiu i descontrolat de la massa tumoral provoca una disminució de l'aport d'oxigen i de nutrients. Això provoca que les concentracions d'oxigen a l'interior del tumor siguin molt variables, de manera que amb freqüència es detecten zones pobrament oxigenades amb pressions parcials d'oxigen menors de 5 mmHg (que corresponen a concentracions d'oxigen del 0,7%), mentre que els teixits oxigenats presenten pressions parcials compreses entre 24 i 66 mmHg (que correspon a concentracions entre 3,1 i 8,7%) (Harris, 2002; Vaupel et al., 2003). En condicions d'hipòxia, les cèl·lules tumorals han de patir diversos canvis adaptatius que permetin la seva supervivència i proliferació. Darrerament ha estat descrit un mecanisme de proliferació cel·lular preferencial en hipòxia lligat a la fosforilació de la histona H2AX en cèl·lules endotelials. Es va observar tant en cèl·lules HUVEC (cèl·lules endotelials de cordó umbil·linal) com en cultius primaris de cèl·lules endotelials com una pèrdua de la histona H2AX induïa una reducció de diferents factors de creixement, com el factor de creixement de fibroblastes 2 (FGF-2), i de la proliferació cel·lular sota condicions hipòxiques (Economopoulou et al., 2009).

La hipòxia tumoral va despertar interès degut als seus efectes sobre la resposta de les cèl·lules tumorals a la radioteràpia. L'eficàcia de la radioteràpia es basa en la producció de radicals lliures d'oxigen a partir de la molècula d'aigua (mecanisme indirecte), ja que aquests són els mediadors dels seus efectes biològics, a través de l'oxidació de lípids, proteïnes i DNA. En absència d'oxigen, els radicals induïts per les radiacions ionitzants en les macromolècules poden ser fàcilment neutralitzats per la donació d'hidrògens procedents des aminoàcids amb un grup -SH. Al contrari, quan els teixits estan ben oxigenats, els radicals lliures no poden ser neutralitzats i el dany químic és fixat. Així doncs, una mateixa dosi de radiació, serà més eficaç quan s'administra sobre un teixit amb una bona perfusió sanguínea, ja que es generarà una major quantitat de dany en el DNA. En canvi, en un teixit hipòxic el dany induït serà 3 vegades menor (Harrison and Blackwell, 2004; Janssen et al., 2005). La presència d'una petita fracció

de cèl·lules hipòxiques i per tant, radioresistents, és capaç de condicionar la resposta del tumor a la radioteràpia ja que aquestes patiran una selecció positiva durant el tractament.

Com en el cas de la radioteràpia, les cèl·lules tumorals hipòxiques presenten resistències a una varietat d'agents citostàtics, fet que es pot justificar per diferents mecanismes. En primer lloc, les cèl·lules hipòxiques es troben més aïllades dels vasos sanguinis i, per tant, estan exposades a concentracions inferiors dels fàrmacs administrats per via sistèmica. Les limitacions en la difusió a través de la matriu extracel·lular i la seva captació per part de les cèl·lules ben difoses justifiquen la menor concentració de fàrmacs trobades en les zones hipòxiques (Bhattacharya et al., 2004). D'altra banda, la hipòxia crònica pot inhibir el cicle cel·lular (Brown and Wilson, 2004). Donat que la majoria dels fàrmacs citotòxics actuals són més efectius sobre les cèl·lules en proliferació, les cèl·lules hipòxiques resulten menys sensibles a la quimioteràpia convencional que les cèl·lules de les zones ben difoses.

Independentment de la resistència a la radioteràpia i a la quimioteràpia, els tumors pobrament oxigenats manifesten un comportament més agressiu que aquells amb una bona oxigenació. La presència de baixes presions parcials de l'oxigen dins del tumor té com a conseqüència la selecció de cèl·lules amb fenotips tumorals més agressius, amb taxes de mutació més altes i major potencial metastàtic. Entre d'altres, la hipòxia s'ha associat amb pitjor pronòstic i amb un augment de metastasis en pacients amb càncer de mama, carcinoma epidèrmic de cèrvix i de cap i coll (Hockel and Vaupel, 2001; Nordmark et al., 2005).

#### 3.1.2.2.1. HIF-1 com a principal factor de transcripció

El factor induïble d'hipòxia (HIF-1) és el principal factor de transcripció regulador de les respostes adaptatives a la hipòxia (Greijer et al., 2005) i pertany a una família de factors de transcripció d'heterodímers  $\alpha$ - $\beta$ . Concretament és un heterodímer format per dues subunitats, HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ , i la seva dimerització és imprescindible per a la unió al DNA. La subunitat  $\beta$  s'expressa constitutivament i manté els nivells proteics constants al nucli en qualsevol condició (hipòxia i normòxia). En canvi, la subunitat  $\alpha$  està subjecta a una forta regulació per la concentració d'oxigen (sobretot a nivell post-traducciona) i és la que controla l'activitat d'HIF-1. En condicions de normòxia, la proteïna és marcada per la doble hidroxilació de residus prolina i ràpidament degradada per la via del proteasoma (Salceda and Caro, 1997) i en condicions d'hipòxia, la subunitat  $\alpha$  és estable i pot entrar a nucli i dimeritzar amb la subunitat  $\beta$ , actuant llavors com a factor de transcripció de diferents gens, com *AKT*, *Her2/Neu*, *EGFR* i *VEGF* (Melillo, 2006).

### 3.1.2.3. Increment de la reparació de ruptures de doble cadena

Les ruptures de doble cadena (DSB) són les lesions més letals provocades per la radiació ionitzant, ja que poden originar aberracions cromosòmiques i provocar una aturada del cicle cel·lular, apoptosi, inactivació gènica i fracàs reproductiu, entre d'altres.

El principal mecanisme de reparació en eucariotes superiors és la reparació no homòloga (NHEJR, *nonhomologous end joining repair*). Aquest és un mecanisme ràpid però potencialment mutagènic ja que es basa en un assaig prova-error: s'uneixen els extrems de DNA que presenten una complementarietat de pocs parells de bases (pb) mitjançant processos que impliquen la degradació nucleotídica dels extrems trencats, l'alineament dels dos extrems que continguin alguns pb d'homologia i el seu lligament. La reparació no homòloga està catalitzada per un complex format per quatre proteïnes, la quinasa dependent de DNA (DNA-PKc), XRCC4, DNA lligasa IV i Artemis. Aquest s'associa amb un altre complex (MRN) de processat de tres proteïnes (Mre11, Nbs1 i Rad51) per unir físicament els extrems trencats. La DNA-PK està formada per tres subunitats, una catalítica (DNA-PKc) i dues reguladores (Ku70 i Ku80). La reparació s'inicia per Ku70/Ku80, que s'uneixen als extrems trencats i recluten a la DNA-PKc per establir la seva unió al DNA i per evitar el processat i la lligació prematurs dels extrems. Després de la juxtaposició dels dos extrems, la DNA-PKc s'autofosforil·la i es dissocia del DNA per a permetre el reclutament dels enzims de processat i de la lligasa IV per unir finalment els extrems (Chen and Nirodi, 2007; Helleday et al., 2007; Rich, 2007).

### 3.1.2.4. Repoblació accelerada

La repoblació accelerada durant el transcurs d'un tractament amb radioteràpia fraccionada ha estat centre de debat des de 1960. La cinètica cel·lular juga un paper important en el desenvolupament d'esquemes de fraccionament de la radiació. A finals dels 80, es va publicar l'estudi on es va demostrar que el creixement del tumor durant extensions del tractament de 5 setmanes a 8 setmanes requeria un increment de dosi de 0,6 Gy/dia per tal de compensar aquesta repoblació (Withers et al., 1988).

## **3.2. Dianes biològiques en radioteràpia**

El coneixement de les bases moleculars de la resistència a la radiació ha conduït al desenvolupament de noves substàncies dirigides específicament contra dianes biològiques. Aquestes substàncies poden actuar directament sobre les cèl·lules tumorals o poden interferir en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i en l'estroma (com per exemple per mitjà d'agents antiangiogènics) (Rodemann et al., 2004). Com també han d'interferir amb els mecanismes

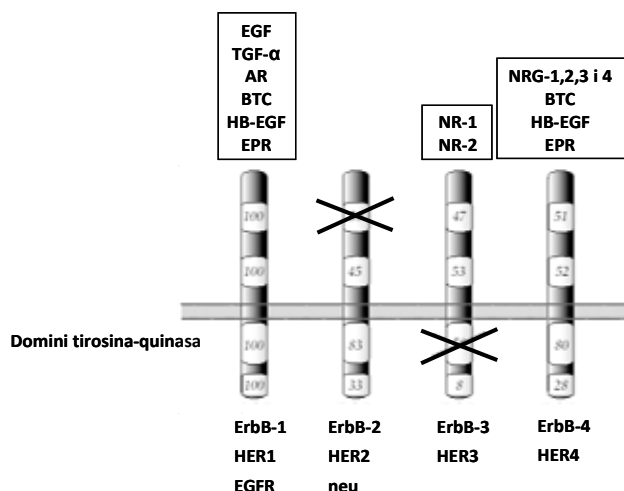
radiobiològics de radioresistència no és necessari l'efecte antitumoral per sí sols per a ser útils en el context de la radioteràpia (Bonner et al., 2006; Lammering et al., 2004; Toulany et al., 2005a; Toulany et al., 2005b).

En general, les dianes biològiques haurien d'estar: (1) sobreexpressades en una elevada proporció de tumors freqüentment tractats per la radiació, (2) no expressades en els teixits normals que envolten el tumor, (3) associades a un baix control local regional del tumor després d'un tractament amb radioteràpia i (4) idealment associades a mecanismes de radioresistència coneguts. La identificació d'aquestes dianes requereix una recerca específica amb models preclínic i amb models *ex vivo* (mostres de malalts tractats amb radioteràpia). Un bon exemple és el receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR). Akimoto i col·laboradors van demostrar a principis dels 90 que l'expressió d'*EGFR* després d'una única dosi de radiació mesurada per western blot en tumors murins es correlacionava inversament amb el control local del tumor (Akimoto et al., 1999). Posteriorment es va fer la mateixa observació en biòpsies tumorals de pacients amb càncer de cap i coll (Ang et al., 2002). En un model preclínic de carcinoma escamós, es va determinar que l'expressió d'*EGFR* durant la radioteràpia fraccionada era variable, i que el seu increment es correlacionava amb una acceleració de la repoblació clonogènica (Petersen et al., 2003). Igual que amb *EGFR*, s'han realitzat diferents estudis amb altres dianes potencials per a la combinació amb la radioteràpia com *HER-2/neu* (receptor del factor epidèrmic de creixement 2 involucrat en el creixement i diferenciació cel·lular), *P53* (gen supressor de tumors implicat en la transició del cicle cel·lular, reparació del DNA i apoptosi), *BCL-2/BAX* (gens proapoptòtics i antiapoptòtics, respectivament), *ciclina D* (quinasa reguladora que modula la progressió de la fase G1 a S del cicle cel·lular) o factors angiogènics (Buffa et al., 2004; Haffty and Glazer, 2003).

## 4. FAMÍLIA DE RECEPTORS ErbB. EGFR

En un sistema biològic, les cèl·lules estan contínuament exposades a diferents estímuls que provenen tant d'altres cèl·lules com del medi extracel·lular. La correcta interpretació i integració de tots aquests senyals és crucial per la supervivència i l'adaptació tant de la cèl·lula com del propi organisme. Durant l'evolució s'han desenvolupat múltiples mecanismes per tal d'interpretar i integrar els senyals cel·lulars correctament, entre els que es troben els receptors de membrana. El grup més destacable és el format pels receptors que tenen activitat tirosina-quinasa (RTK) ja que són capaços de traduir la informació que prové de l'exterior a l'interior de la cèl·lula modulant, finalment, l'expressió gènica (Singh and Harris, 2005).

S'han descrit uns 58 receptors tirosina-quinasa, que s'han dividit en 20 famílies. Una de les més conegudes és la família ErbB, que consta de 4 receptors estructuralment força similars: EGFR/ErbB-1/HER1, ErbB-2/Neu/HER2, ErbB-3/HER3 i ErbB-4/HER4 (Robinson et al., 2000; Yarden and Sliwkowski, 2001) (Figura 3). D'entre aquests receptors, cal destacar HER2 al qual, fins al moment, no se li coneix cap lligand però que és la parella preferida pels altres receptors a l'hora de formar dímers, i HER3 que no té activitat tirosina-quinasa. Junt amb els seus lligands juguen un paper important en la regulació de processos biològics com la proliferació, supervivència i migració cel·lular. La desregulació de la seva activitat està associada amb la tumorogènesi, fet que els classifica com marcadors de superfície més freqüentment implicats en càncer (Hynes and Macdonald, 2009).



**Figura 3. Esquema dels membres de la família de receptors i els seus lligands.** La família ErbB consta de quatre membres: EGFR, ErbB-2, ErbB-3 i ErbB-4. Els números (%) indiquen el grau d'homologia amb EGFR. No es coneix cap lligand natural d'ErbB-2 i ErbB-3 no té activitat tirosina-quinasa. Els dominis no funcionals s'indiquen amb una X. Extret de Harari, 2004.

#### 4.1. Receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR)

El receptor del factor epidèrmic de creixement és una glicoproteïna transmembrana de 170 KDa que conté una sola cadena polipeptídica de 1186 aminoàcids. Es sintetitza en forma d'un precursor de 1210 aminoàcids que en el procés d'inserció en la membrana plasmàtica pateix una glicosilació i un escurçament en l'extrem N-terminal. El gen està localitzat en el braç curt del cromosoma 7, concretament a la regió 7p11.2.

Com tots els membres de la seva família, estructuralment està format per 3 dominis principals: un domini extracel·lular d'unió a lligand, un domini transmembrana hidrofòbic i un domini intracel·lular amb activitat tirosina-quinasa. El domini extracel·lular està dividit en 4 regions designades I, II, III i IV. Les regions I i III corresponen a llocs d'unió a lligand, mentre que les regions II i IV participen en la dimerització del receptor (Grunwald and Hidalgo, 2003; Harari, 2004). La regió citoplasmàtica conté un domini tirosina-quinasa, format per un lòbul N i un lòbul C on trobem el bucle d'activació. Aquest domini està seguit per una cua carboxi-terminal amb llocs d'autofosforil·lació (Figura 4).

EGFR és essencial pel desenvolupament, i s'estima que en cèl·lules normals la seva expressió va de 40.000 a 100.000 receptors per cèl·lula, mentre que aquestes xifres es poden veure augmentades un ordre de magnitud en les cèl·lules tumorals. Aquest augment s'associa amb un increment en la producció autocrina de lligands, com ara TGF- $\alpha$ , per part de les cèl·lules transformades (Mandic et al., 2006; Mendelsohn and Baselga, 2003; Zimmermann et al., 2006).

##### 4.1.1. Lligands

A més de factor epidèrmic de creixement (EGF), es coneixen 5 lligands naturals de l'EGFR: factor de creixement transformant  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), amfirregulina (AR), epirregulina (ER), betacelulina (BTC) i factor de creixement epidèrmic d'unió a heparina (HB-EGF) (Figura 3, pàgina anterior). Aquests són sintetitzats com a precursors transmembrana i els seus ectodominis han de ser processats mitjançant un tall proteolític dut a terme per proteases de la família ADAM (*a disintegrin-like and metalloproteinase containing proteins*). Aquest tall resulta en la lliberació del factor de creixement soluble. En condicions fisiològicament normals l'activació del receptor es controla tant per mitjà de l'expressió espacial i temporal dels seus lligands (Yarden and Sliwkowski, 2001) com per la disponibilitat del lligand soluble regulada per proteòlisi (Arribas and Borroto, 2002).

#### 4.1.2. Dimerització

En absència de lligand el receptor és monomèric, però quan s'hi uneix provoca un canvi conformacional d'EGFR que promou la dimerització amb un altre EGFR (homodimerització) o amb un altre membre de la seva família (heterodimerització). Aquest últim cas permet diversificar i expandir molt el tipus de senyal generat per un receptor (Figura 4).

Quan el receptor està inactiu (no unit a lligand) es caracteritza per adoptar una conformació "tancada", en la que el braç de dimerització de la regió II està bloquejat per interaccions intramoleculares amb el domini IV. Quan s'uneix a lligand es dona una reorganització de les regions donant lloc a una conformació "oberta", on les regions I i III estan accessibles pel lligand. A més, el braç de dimerització (present en la regió II) queda exposat i pot interaccionar amb el d'un altre receptor, promovent la unió directa receptor-receptor. En aquest dímer format per dos complexos 1:1 receptor-ligand, els dos lligands estan distanciats l'un de l'altre i només interaccionen amb el receptor, fet que indica que els lligands no estan involucrats en la dimerització (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002).

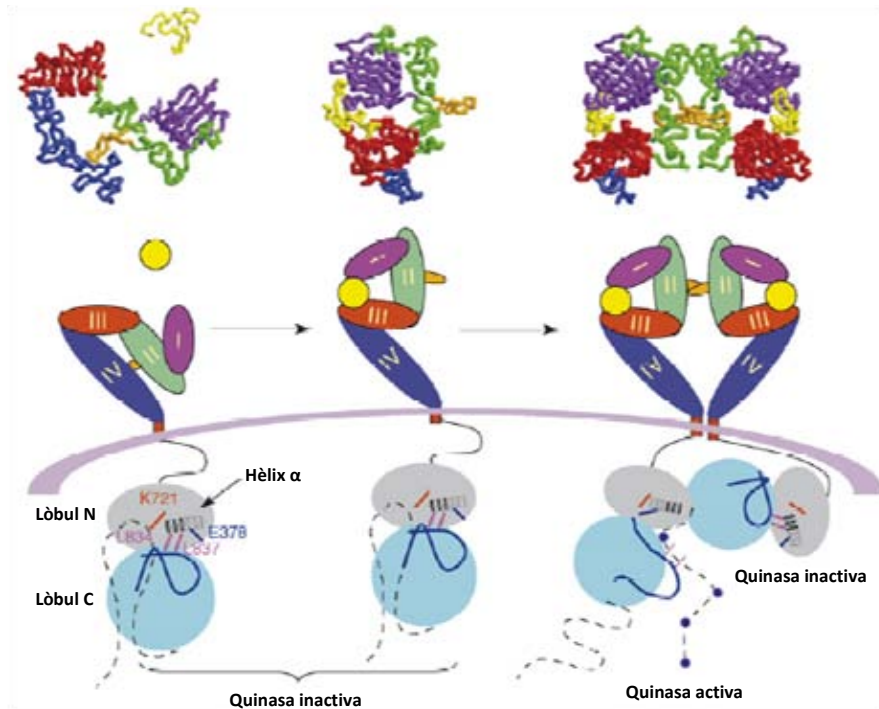
#### 4.1.3. Fosforil·lació

Com a conseqüència de la dimerització del receptor els dominis tirosina-quinasa dels dos receptors formen un dímer asimètric. En aquest dímer el lòbul C d'un receptor entra en contacte amb el lòbul N del segon receptor present (Zhang et al., 2006). Aquesta interacció activa al·lostèricament el domini quinasa del segon receptor mitjançant un canvi conformacional que afecta el bucle d'activació present en el lòbul C.

Finalment, la cua carboxi-terminal del receptor, que es trobava interaccionant amb el domini quinasa en una conformació autoinhibitòria, s'allibera i es fosforil·la en residus tirosina específics (Landau et al., 2004).

#### 4.1.4. Vies de senyalització

Els residus tirosina fosforil·lats serveixen com a llocs d'ancoratge per a nombroses proteïnes adaptadores que inicien vies de transducció intracel·lulars. Aquestes proteïnes s'uneixen a través dels seus dominis d'homologia a Src-2 (SH2) o d'unió a fosfotirosines (PTB), mentre que l'especificitat del reclutament està determinada pels aminoàcids que envolten els llocs d'autofosforil·lació del receptor (Olayioye et al., 2000).



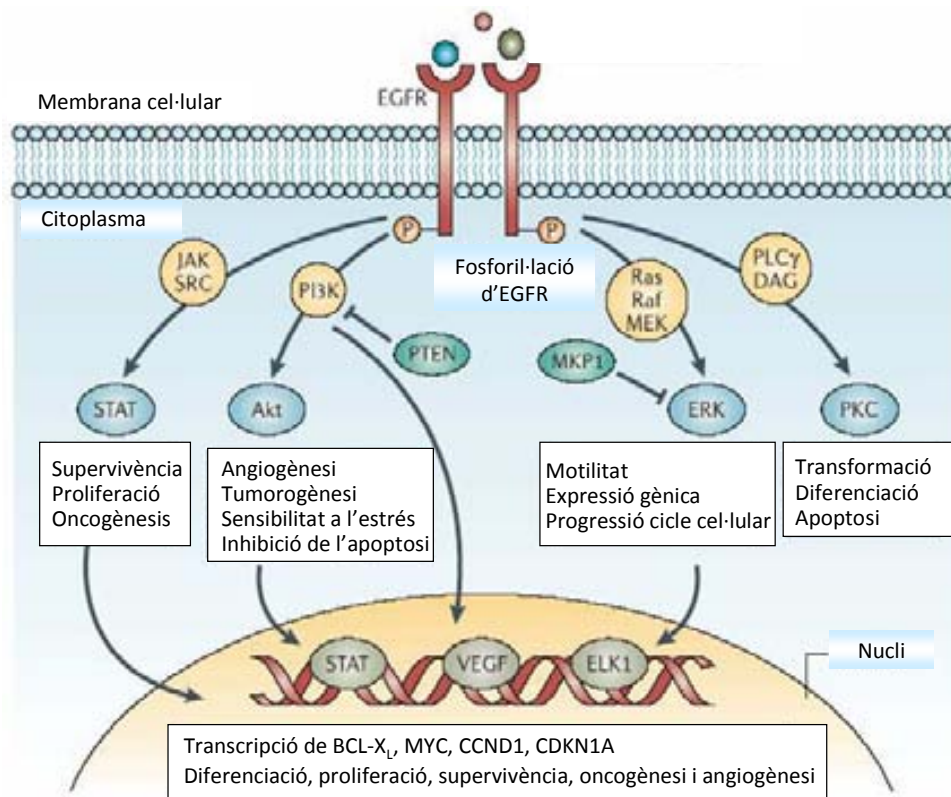
**Figura 4. Representació estructural d'EGFR i la seva activació.** (Esquerra) Quan el lligand -groc- no està unit al receptor aquest es troba en forma inactiva incapaç de dimeritzar. (Centre) La unió del lligand a les regions I i III provoca un canvi conformacional que desmascara el loop de dimerització -taronja-, abans envoltat per les regions II i IV. (Dreta) La dimerització dels receptors està mediada pels loops de dimerització. A nivell intracel·lular els dominis tirosina-quinasa es juxtaposen, i la quinasa del lòbul C d'un receptor interacciona amb la del lòbul N de l'altre receptor. Aquesta orientació provoca una transautofosforil·lació dels residus tirosina. Extret de Bublil,2007.

La regulació dels senyals intracel·lulars activats és complexa ja que hi participen diversos factors com la identitat del lligand, els receptors presents en la cèl·lula, la disponibilitat de molècules intracel·lulars o els efectors que apaguen el senyal. Les principals vies de transducció de senyals activades per l'EGFR són (Herbst, 2004) (Figura 5):

1. Via de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK): quan estan actives es transloquen al nucli on fosforilen factors de transcripció específics implicats en proliferació, supervivència i transformació cel·lular.
2. Via del fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K): és la principal via que s'activa quan EGFR es dimeritza amb HER3. Està implicada en creixement, proliferació, supervivència i motilitat cel·lular.
3. Via de la quinasa Janus i activadors de transcripció (JAK/STAT): STAT es transloca al nucli i directament indueix la transcripció de gens que medien la divisió cel·lular, supervivència, motilitat, invasió i reparació del DNA.



4. Via de la proteïna quinasa C (PKC): implicada en la progressió del cycle cel·lular, motilitat cel·lular i invasió.



**Figura 5. Principals vies de senyalització regulades per EGFR.** Extret de Nyati, 2006.

Un lligand específic desencadena preferencialment l'activació d'una via de senyalització. Per exemple, EGF activa preferentment la cascada de la fosfolipasa c, mentre que TGF- $\alpha$  actua a favor de la via de JAK/STAT.

#### 4.1.5. Activació d'EGFR independent de lligand

S'han descrit altres mecanismes capaços d'induir la fosforil·lació d'EGFR de manera independent de lligand. Aquests poden ser:

1. Transactivació: existeixen proteïnes que són capaces de fosforilar residus de tirosina de la regió intracel·lular del receptor. Per exemple, l'hormona de creixement i la prolactina activen indirectament el receptor a través de la tirosina-quinasa Janus2 (Jak2) (Hynes and Lane, 2005), i Src és capaç de fosforil·lar els residus de tirosina 845 i 1101 (Biscardi et al., 1999). Un dels mecanismes més estudiats és el mediat per les proteïnes G associades a receptor (GPCRs), que estimulen les metaloproteases

encarregades del processament dels precursors dels lligands de la família d'EGF (Gschwind et al., 2003).

2. Com a resposta a una situació d'estrés: el receptor pot ser activat com a resposta a agents genotòxics (Boerner et al., 2003; Simeonova et al., 2002) i a la radiació ionitzant (Dittmann et al., 2005a; Schmidt-Ullrich et al., 1997). En l'últim cas, s'ha demostrat que la radiació ionitzant estimula la fosforil·lació de tirosines de l'EGFR en les cèl·lules procedents de carcinoma escamós MCF-7, A431 i A549, provocant un creixement accelerat com a resposta adaptativa, demostrat també en cèl·lules no neoplàsiques (Dittmann et al., 2005a; Dittmann et al., 2009; Schmidt-Ullrich et al., 1997; Schmidt-Ullrich et al., 1996). Fins el moment, el mecanisme pel qual EGFR s'activa en resposta a l'estrés oxidatiu no es coneix completament, però sembla que l'activació de la quinasa Src juga un paper important en aquest procés. En un estudi recent la radiació induïx una peroxidació lipídica associada a una activació de Src i una posterior internalització d'EGFR, translocació del receptor al nucli i l'estimulació del procés de reparació del DNA. La radiació provocaria una activació de Src i l'estabilització d'EGFR es podria donar per l'addició d'un dels principals productes de la peroxidació lipídica, l'hidroxi-nonenal (HNE). La producció de HNE estaria lligada a la formació del complex EGFR-Src després d'una dosi de radiació (Dittmann et al., 2009). D'altra banda, la fosforil·lació d'EGFR també es donaria per la generació d'òxid nítric (NO) radioinduit (Lee et al., 2008).

#### **4.1.6. Internalització**

Després de la unió a lligand, els homo o heterodímers s'internalitzen en major o menor grau en vesícules recobertes de clatrina mitjançant endocitosis mediada per lligand (Ceresa and Schmid, 2000). Aquest procés permet l'atenuació del senyal generat a la membrana. Per tal de ser internalitzat, el receptor, una vegada activat, recluta la proteïna c-Cbl (procés anomenat ubiquitinització) necessària per a la formació d'una vesícula d'internalització i degradació en el proteasoma (Hynes et al., 2001). Els receptors internalitzats continuen essent enzimàticament actius, hiperfosforil·lats i associats a proteïnes de transducció del senyal. Tot i així, el senyal transmès des dels endosomes d'internalització és qualitativament diferent al generat a la membrana plasmàtica ja que la capacitat d'activar les diferents vies de senyalització es veu atenuada; en concret, s'ha vist que l'EGFR no és capaç d'activar la via PLC quan està essent internalitzat (Singh and Harris, 2005).

S'ha comprovat que l'EGFR, un cop activat i a diferència d'altres receptors de la mateixa família, és ràpidament internalitzat per a la seva degradació o reciclatge. El pH de la vesícula d'internalització és lleugerament àcid, per tant els complexos que siguin estables en aquestes condicions, com és el cas d'EGF unit a EGFR, seran degradats. D'altra banda, lligands que no són tant estables a pH àcids es separen molt aviat del receptor afavorint així el reciclatge a membrana; és el cas de TGF- $\alpha$  (Olayioye et al., 1998). En aquest cas el senyal mitogènic és més potent.

#### 4.1.6.1. Internalització al nucli

Tot i que la via més coneguda de transducció de senyals situa EGFR en la membrana plasmàtica, estudis recents indiquen una possible via de senyalització en la que el receptor o algun fragment d'aquest viatja directament des de la membrana fins el nucli. S'ha observat localització d'EGFR en el nucli tant en línies cel·lulars establertes com en diferents tumors primaris de càncer de mama. Aquesta localització també es troba, però, en un ampli ventall de teixits no tumorals sota condicions fisiològiques diverses.

Lin i col·laboradors, al 2001 van demostrar que en un 10% dels casos EGFR es translocava al nucli de manera dependent de lligand (Lin et al., 2001). Recentment, s'ha demostrat que també es pot donar aquesta translocació de manera independent de lligand com a resposta a la radiació ionitzant (Dittmann et al., 2005a). El domini transmembrana conté una seqüència de localització nuclear (Lo et al., 2005), que fa que el receptor es pugui internalitzar en el nucli a través bé del complex de porus nuclear o de la interacció amb receptors de transport nuclear com importines i exportines.

Tot i que el seu paper no està clar, se li han atribuït dues funcions principals en el nucli: (1) com a cofactor de transcripció i (2) fosforil·lació de l'antigen de proliferació nuclear (PCNA). En el primer cas, a través d'interaccions físiques i funcionals EGFR s'associa a STAT3 i E2F1 utilitzant el lloc d'unió a DNA d'aquests per afavorir la transcripció de la ciclina D1, iNOS, B-Myb i la quinasa Aurora A mitjançant la seva activitat transactivadora (Hanada et al., 2006; Hung et al., 2008; Lin et al., 2001; Lo et al., 2005; Lo and Hung, 2006). En segon lloc, s'ha demostrat que EGFR fosforila PCNA en la tirosina 211, estabilitzant així la seva unió amb la cromatina. Aquest procés es correlaciona amb una pronunciada proliferació cel·lular (Wang et al., 2006).

D'altra banda, el receptor pot interaccionar amb la proteïna quinasa dependent de DNA (DNA-PKC) per a promoure la reparació dels trencaments de doble cadena induïts per la radiació ionitzant (Dittmann et al., 2005a; Li et al., 2009; Lin et al., 2001; Lo and Hung, 2006). Tot i que les dianes transcripcionals estan molt relacionades amb tumorigènesi, proliferació i progressió tumoral, de moment no s'ha establert el significat biològic i la rellevància de la presència d'EGFR en el nucli.

#### 4.2. EGFR i el càncer

La freqüència de sobreexpressió d'EGFR en carcinomes humans és generalment elevada, donant-se en un 100% dels casos en alguns tumors de cap i coll (Taula 1). Els nivells d'RNA i proteïnes són elevats en tumors, mentre que aquests disminueixen en la mucosa o en lesions displàsiques adjacents, fets que indiquen que l'amplificació del receptor juga un paper important en la carcinogènesi (Harari, 2004; Mendelsohn, 2002; Rubin Grandis et al., 1996). A més, les dianes transcripcionals de l'EGFR nuclear estan implicats en la progressió tumoral (Lo and Hung, 2006). En general, la sobreexpressió està associada a mal pronòstic i resistència a agents citotòxics, incloent la radiació ionitzant.

**Taula 1. Expressió d'EGFR en càncer.**

<b>Tipus de tumor</b>	<b>% de tumors</b>
Vesícula	31-48
Mama	14-91
Cèrvix	90
Còlon	25-77
Esòfag	43-89
Estòmac	4-33
SNC	40-63
Cap i coll	80-100
Ovari	35-70
Pàncrees	30-89
Pròstata	40-80
Pulmó de cèl. no petita	40-80

Els principals mecanismes pels quals el receptor està constitutivament activat en molts tipus de càncer són la producció autocrina de lligand, la sobreexpressió del receptor i la mutació (Thariat et al., 2007; Zandi et al., 2007):

- Increment de la producció de lligands. TGF- $\alpha$  i EGF es troben habitualment co-expressats amb EGFR en diferents tipus de càncer, i es considera que actuen de

manera autocrina i paracrina, conduint a l'activació constitutiva del receptor i a un creixement tumoral incontrolat (Schmidt-Ullrich et al., 1997). Els lligands poden ser secretats per macròfags, cèl·lules T i queratinòcits en resposta al dany tissular, però també per les mateixes cèl·lules tumorals.

- Increment dels nivells d'EGFR. Elevats nivells d'EGFR s'han correlacionat amb un descens de la supervivència en càncers com el de cap i coll, vesícula, ovari, cèrvix i esòfag (Nicholson et al., 2001). L'habilitat de transformació en aquesta situació pot ser deguda a una activació constitutiva del receptor causada per una dimerització espontània com a resultat de la proximitat física dels receptors (Pedersen et al., 2005), a una amplificació del gen d'*EGFR* o a una potenciació de la transcripció. S'ha demostrat l'existència d'amplificació gènica en diferents tipus de tumors, i sol estar associada a la sobreexpressió proteica, tot i que la sobreexpressió d'EGFR en absència d'amplificació gènica també ha estat descrita i s'atribueix a un increment en l'activitat del promotor de l'*EGFR* o una deregulació a nivell transcripcional i traduccional (Normanno et al., 2003; Salomon et al., 1995; Zandi et al., 2007). El possible significat pronòstic de la sobreexpressió i les mutacions del gen de l'*EGFR* s'ha analitzat en diversos estudis en pacients amb càncer de cap i coll localment avançat (HNSCC), de pulmó de cèl·lula no petita (NSCLC) i de còlon. L'amplificació del gen de l'*EGFR* es dona en HNSCC, però la seva taxa varia substancialment en funció dels estudis realitzats. De la mateixa manera, i probablement degut a la falta d'homogeneïtat en les tècniques utilitzades (FISH i qRT-PCR), s'han trobat resultats discordants en la correlació entre l'expressió d'aquest receptor i l'evolució del pacient (Ch'ng et al., 2008; Chiang et al., 2008; Chung et al., 2006; Freier et al., 2005; Sheu et al., 2009; Sok et al., 2006). En canvi, en NSCLC i còlon sí que s'ha descrit una correlació positiva en resposta a teràpies amb anticossos anti-EGFR a la clínica (Cappuzzo et al., 2008; Hirsch et al., 2008; Moroni et al., 2005; Sartore-Bianchi et al., 2007).
- Mutacions. La mutació més freqüent i millor caracteritzada d'*EGFR* trobada en càncer és la que produeix la variant *EGFRvIII*. És el resultat d'una deleció dels exons 2-7, que codifiquen per la regió I i dues terceres parts de la regió II del domini extracel·lular. El receptor truncat resultant, per tant, no té els dominis corresponents a la unió a lligand. D'aquesta manera es dona lloc a la transformació de manera independent de lligand (Pedersen et al., 2001). Aquesta mutació es troba principalment en gliomes, càncer de pròstata, mama, pulmó de cèl·lula no petita, ovari i cap i coll (Zandi et al., 2007).

Recentment, també s'han detectat mutacions puntuals o petites delecions en el domini quinasa de l'*EGFR* (dels exons 18 al 21), presents majoritàriament en malalts amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita (NSCLC). La mutació T790M a l'exó 20 confereix resistència a l'inhibidor de la regió tirosina-quinasa erlotinib i la L858R indueix sensibilitat. El descobriment d'aquesta subpoblació de casos de NSCLC ha suposat una certa revolució en el tractament d'aquesta patologia, sobretot en l'ús de biomarcadors de resposta als inhibidors tirosina-quinasa gefitinib i erlotinib (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao and Miller, 2005). Aquests tipus de biomarcadors es desconeixen en el cas dels anticossos anti-EGFR.

### **4.3. Paper d'EGFR en radioteràpia. Resistència a la radiació**

L'elevada expressió del receptor del factor epidèrmic de creixement ha estat correlacionat amb mal pronòstic en pacients amb càncer de cap i coll tractats amb radioteràpia. Aquesta relació també s'ha observat en càncers de nasofaringe, esòfag, úter, recte i gliomes. S'han suggerit diferents mecanismes pels quals EGFR estaria implicat en la resistència a la radioteràpia.

#### **4.3.1. Repoblació accelerada**

La radiació ionitzant pot induir la proliferació cel·lular. Mentre que en cada fracció de radiació es redueix el nombre de cèl·lules clonogèniques (depoblació), la proliferació en les cèl·lules supervivents s'accelera. Després de diverses setmanes de tractament amb radioteràpia fraccionada es produeix un enriquiment relatiu en el nombre de cèl·lules tumorals clonogèniques, fet que contribueix a la repoblació dels tumors. La repoblació és l'explicació més plausible a la pèrdua de control tumoral associada a la duració de la radioteràpia fraccionada. Quan s'incrementa el període total del tractament, es requereix una dosi més gran per eradicar el tumor. Per aquest motiu s'està estudiant reduir el temps del tractament en un intent per reduir la repoblació. De fet, en els pacients amb càncer escamós de cap i coll amb una expressió elevada d'EGFR s'ha observat un benefici d'aquest escurçament, suggerint un paper important d'EGFR en la repoblació (Bentzen et al., 2005; Eriksen et al., 2005). Aquest fet està recolzat per dades preclíniques. Schmidt-Ullrich i col·laboradors van observar a principis dels 90 que les cèl·lules que sobreviuen a la radiació adquirien un fenotip més agressiu on hi havia sobreexpressió d'EGFR i TGF- $\alpha$  (Schmidt-Ullrich et al., 1994). A més, van demostrar que la radiació incrementava la fosforil·lació de les tirosina-quinasa intracel·lulars, crítiques en les vies de senyalització mitogèniques (Schmidt-Ullrich et al., 2003). En un estudi posterior amb xenoempelts provinents de cèl·lules de carcinoma escamós, també es va

correlacionar l'elevada expressió d'EGFR amb la repoblació accelerada dels tumors després de diverses dosis de radiació (Petersen et al., 2001). El mecanisme molecular que es proposa és que l'activació del receptor per la radiació ionitzant simula els efectes provocats pels factors de creixement (Schmidt-Ullrich et al., 1999).

#### **4.3.2. Efecte d'EGFR sobre la radiosensibilitat**

La primera evidència de que l'expressió d'EGFR podia afectar la radiosensibilitat intrínseca cel·lular *in vivo* prové d'experiments realitzats en models murins per Akimoto i col·laboradors (Akimoto et al., 1999). Van mostrar que una única dosi de radiació induïa la fosforil·lació d'EGFR i l'activació de les vies de senyalització només en aquells tumors que sobreexpressaven EGFR. Aquest fenomen estava associat a radioresistència. Com que la repoblació dels clonògens no juga cap paper en determinar la resposta *in vivo* a una única dosi de radiació (Milas et al., 2002), aquests resultats suggerien que el receptor del factor epidèrmic de creixement contribueix en la determinació de la sensibilitat intrínseca. Estudis amb fragments de tumors de pacients amb càncer de cap i coll recolzen aquesta idea (Ang et al., 2002).

#### **4.3.3. Translocació d'EGFR al nucli**

Estudis dirigits per Dittmann i col·laboradors (Dittmann et al., 2005a) van mostrar com, en contrast amb la senyalització citoplasmàtica induïda per EGF, la radiació provoca una translocació d'EGFR al nucli de la cèl·lula. Aquest procés està acompanyat per un influx de les proteïnes Ku70/80 i fosfatasa 1. Com a conseqüència hi ha un increment de l'activitat de la quinasa dependent de DNA (DNA-PK) i la formació de complexos proteics que la contenen, essencials per la reparació de ruptures de doble cadena de DNA induïdes per la radiació ionitzant. El bloqueig de l'EGFR amb un anticòs monoclonal va inhibir, d'una banda, l'import d'EGFR al nucli, l'activació de la DNA-PK i la reparació de les DSB i, de l'altra, va potenciar la sensibilitat a la radiació.

#### **4.4. EGFR com a diana terapèutica**

El receptor del factor epidèrmic de creixement va ser el primer receptor associat a càncer. Les neoplàsies que normalment estan vinculades a la desregulació d'aquest receptor inclouen les de cap i coll, pulmó, còlon i mama. És més, donada la correlació entre la sobreexpressió d'EGFR i la progressió tumoral, la inhibició d'aquest receptor ha esdevingut una estratègia important en la lluita contra el càncer.

Actualment s'han desenvolupat diverses estratègies encaminades al bloqueig de la via de transducció de senyals iniciada per l'EGFR per regular o inhibir els seus efectes. Les principals són els anticossos monoclonals (mAbs) dirigits contra la part extracel·lular del receptor i les molècules de baix pes molecular que interfereixen amb l'activitat tirosina-quinasa intracel·lular (TKIs) (Mendelsohn and Dinney, 2001). Degut a que el mode d'actuació d'aquests compostos pot ser diferent al de les teràpies convencionals, quimioteràpia i radioteràpia, és interessant combinar-los per tal d'obtenir efectes additius o sinèrgics.

Els anticossos monoclonals mostren major afinitat pel receptor comparat amb els compostos petits, per tant es requereix menys quantitat per tal d'inhibir EGFR. Ara bé, han de ser administrats per via intravenosa, mentre que els compostos de baix pes molecular es poden administrar oralment. Els anticossos, però, presenten una sèrie d'inconvenients com ara que poden generar una resposta immunològica que pot comportar una ineficàcia del tractament. A més, poden ser menys efectius o totalment inefectius contra formes truncades de l'EGFR, com en el cas de la variant *EGFRvIII*, freqüent en glioblastoma multiforme (Herbst, 2004), que és deficitària de la major part del seu domini extracel·lular (Lammering et al., 2004). A nivell intracel·lular, tant mAbs com TKIs tenen efectes intracel·lulars similars: les dues estratègies bloquegen les principals vies de senyalització d'EGFR i per tant la proliferació cel·lular (Albanell et al., 2001; Franklin et al., 2002).

A continuació, descriurem l'anticòs monoclonal cetuximab ja que ha sigut objecte del nostre estudi.

#### **4.5. Teràpia anti-EGFR: IMC-C225 (C225, cetuximab o erbitux)**

Cetuximab és un anticòs monoclonal quimèric obtingut a partir de la combinació de la regió variable de l'anticòs murí amb la regió constant IgG1 humana. S'uneix específicament a EGFR amb una afinitat molt elevada (superior als lligands naturals de l'EGFR), competeix amb la unió a lligand i bloqueja l'activació del receptor per EGF o TGF- $\alpha$ . Estudis preclínics han demostrat com cetuximab inhibeix l'activació de factors de creixement de la via de senyalització MAPK, i per tant, la proliferació cel·lular (Albanell et al., 2001; Peng et al., 1996; Wu et al., 1996).

##### **4.5.1. Mecanismes d'acció**

L'activitat antitumoral de cetuximab s'ha atribuït a diferents mecanismes:



- Inhibició de la progressió del cicle cel·lular. Experiments inicials van mostrar com tant cetuximab com el seu progenitor murí M225 provocaven una aturada del cicle a G1, fase prèvia a la síntesi de DNA. El tractament amb C225 causa un increment de l'expressió de l'inhibidor del cicle cel·lular p27<sup>kip-1</sup>. Aquest fet provoca un augment en la formació del complex inductor p27<sup>kip-1</sup>-Cdk2, responsable de l'aturada a G1 (Huang et al., 1999).
- Potenciació de l'apoptosi. La supervivència cel·lular és depenent, en part, de l'equilibri entre Bax (que promou l'apoptosi) i Bcl-2 (que protegeix les cèl·lules de l'apoptosi) (Pepper et al., 1997). Diversos estudis han mostrat com cetuximab pot alterar aquesta ratio incrementant l'expressió de Bax i induir, per tant, l'apoptosi (Huang et al., 1999; Liu et al., 2000; Tortora et al., 1999; Wu et al., 1995). A més, la combinació amb diferents agents quimioterapèutics augmenten la mort cel·lular programada en diferents models tant *in vitro* com *in vivo* (Bruns et al., 2000; Ciardiello et al., 1999; Tortora et al., 1999).
- Inhibició de l'angiogènesi. S'ha demostrat en diferents estudis que el bloqueig de l'EGFR per cetuximab provoca un descens en la producció de factors angiogènics com el factor de creixement bàsic de fibroblastes (bFGF), el factor de creixement vascular endotelial (VEGF) i la interleukina-8 (IL-8) (Bruns et al., 2000; Perrotte et al., 1999; Petit et al., 1997). Aquest descens s'ha correlacionat amb un descens en el número de vasos sanguinis (Perrotte et al., 1999) i en un increment de l'apoptosi de cèl·lules endotelials en xenoempelts humans.
- Inhibició de la invasió cel·lular i metàstasi. Perrote i col·laboradors van mostrar com cetuximab inhibia l'aparició de metàstasis al pulmó en ratolins amb xenoempelts establerts a partir de tumors humans (Perrotte et al., 1999). A més, s'ha demostrat que l'anticòs també és capaç d'inhibir l'expressió i l'activitat de diferents metal·loproteïnasses (MMPs), que juguen un paper important en l'adhesió i en la disseminació de la cèl·lula tumoral. Aquest descens s'ha correlacionat amb una reducció en la invasió tumoral *in vitro* i amb la inhibició del creixement tumoral i metàstasis en ratolins atímics (P et al., 2000; P et al., 1999; Perrotte et al., 1999).

- Inhibició de la reparació. Cetuximab bloqueja el transport d'EGFR al nucli, prevenint d'aquesta manera l'activació de la quinasa dependent de DNA (DNA-PK) implicada en la reparació del dany al DNA (Dittmann et al., 2005b; Huang and Harari, 2000).
- Potenciació dels efectes antitumorals de la quimioteràpia i radioteràpia. A principis dels 90 ja es va observar com cetuximab tenia la capacitat de potenciar els efectes antitumorals del cisplatí en un model murí amb xenoempelts establerts a partir de la línia tumoral de carcinoma escamós A431 (Fan et al., 1993). Estudis successius van mostrar aquest efecte sinèrgic quan es combinava amb altres agents quimioterapèutics com la gemcitabina (Bruns et al., 2000), docetaxel (Overholser et al., 2000; Tortora et al., 1999), paclitaxel (Inoue et al., 2000) i topotecan (Ciardiello et al., 1999). D'altra banda, també es va demostrar que la combinació de cetuximab amb la radiació podia provocar una regressió completa de xenoempelts establerts a partir de carcinomes escamosos de cap i coll, mentre que l'administració de cetuximab o radiació per si sols provoquen un retard en el creixement del tumor (Bonner et al., 2000; Milas et al., 2000). Els mecanismes involucrats en aquest fet inclouen l'efecte de la radiació sobre l'apoptosi cel·lular amb una pèrdua de la clonogenicitat (Bonner et al., 2000; Huang et al., 1999), reducció de la proliferació cel·lular, i un increment en la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a la radiació (Huang et al., 1999).

És rellevant fer ènfasi en què en la majoria d'estudis l'anticòs és més efectiu *in vivo* que *in vitro*. Aquest fet podria explicar-se pels efectes inhibidors sobre la invasió, metàstasi i angiogènesi tumoral, variables de difícil visualització en les condicions experimentals dels models *in vitro*.

#### **4.5.2. Combinació de cetuximab i radiació. Estudis clínics**

Són diversos els estudis clínics on s'ha avaluat l'eficàcia de cetuximab en combinació amb quimioteràpia: càncer de pulmó de cèl·lula no petita, càncer de còlon i càncer de pàncrees (Ciardiello and Tortora, 2008). La combinació de cetuximab i radioteràpia, però, només ha estat avaluada en pacients amb carcinoma escamós de cap i coll localment avançat en un estudi dissenyat l'any 1999 i publicat al 2006. En aquest estudi randomitzat en fase III es va comparar la combinació de cetuximab i radioteràpia *versus* radioteràpia sola (Bonner et al., 2006). Es van incloure un total de 424 pacients amb un seguiment mínim de 24 mesos i es va observar una millora significativa en el control locorregional (9,5 mesos) i en la supervivència global (19,7 mesos) en el cas del tractament combinat. A més, l'addició de cetuximab a la

radiació també va prolongar significativament la supervivència lliure de malaltia. En l'actualitat s'està avaluant l'eficàcia de l'anticòs en combinació amb radioteràpia, cisplatí i 5-fluorouracil (Bernier et al., 2009).

Arran dels resultats d'estudis clínics, l'anticòs cetuximab va ser aprovat l'any 2004 per l'Agència americana del medicament (FDA) pel tractament del càncer colorectal avançat resistent a una teràpia basada amb irinotecan i, posteriorment, l'any 2006 en combinació amb la radioteràpia pel tractament de carcinoma escamós de cap i coll localment avançat.

En aquest context, amb dades clíniques i preclíniques que suggereixen un possible benefici en el manteniment de cetuximab després de la radioteràpia, es va iniciar el juny del 2005 un estudi pilot aleatoritzat, promogut per l'Institut Català d'Oncologia, multicèntric i en fase II per avaluar l'eficàcia i la seguretat de la combinació de cetuximab amb radioteràpia seguida o no de cetuximab adjuvant i en el que participen un total de 20 centres espanyols.



**Hipòtesi**



En els malalts amb càncer, la hiperactivitat del receptor del factor epidèrmic de creixement (EGFR) té mal pronòstic. L'EGFR està sobreexpressat en diferents tipus de tumors, entre els que destaquen el càncer de còlon, pulmó, pàncrees i cap i coll. A més, donada la cooperació amb altres membres de la família d'EGFR (erbB2, erbB3 i erbB4) es podria ampliar aquesta llista amb altres neoplàsies altament prevalents, com per exemple el càncer de mama. La majoria d'aquestes neoplàsies requereixen tractament amb radioteràpia amb el que s'aconsegueix, en un elevat percentatge de casos, una bona resposta. En canvi, l'existència de cèl·lules resistents a la radiació enfosqueix el control tumoral. Una de les causes més importants de radioresistència és la hiperactivitat de l'EGFR. Aquest mecanisme s'ha relacionat amb l'acceleració del creixement tumoral durant la radioteràpia, sobretot en tumors altament dependents del receptor del factor epidèrmic de creixement. La recerca d'estratègies per a contrarestar aquesta resistència ha donat lloc a tractaments de radioteràpia hiperfraccionada i de concomitància (radioquimioteràpia) que han mostrat un augment significatiu del control local, tot i que a expenses d'una major toxicitat. Recentment, la síntesi d'inhibidors de l'EGFR i la translació a la clínica d'aquestes substàncies ha demostrat l'existència d'una estratègia menys tòxica per a compensar la resistència tumoral, essent paradigmàtic l'augment de supervivència en tumors de cap i coll localment avançat tractats amb la combinació de radioteràpia i cetuximab. Sens dubte, l'èxit d'aquesta combinació ha suposat un punt d'inflexió en la investigació i el tractament del càncer en neoplàsies altament dependents d'EGFR, i ha provocat un creixent interès en el desenvolupament d'estudis clínics per avaluar el seu ús com a potencial tractament adjuvant.

La hipòtesi d'aquesta Tesi Doctoral és que el tractament amb cetuximab després de la radioteràpia podria inhibir la proliferació de cèl·lules supervivents residuals incrementant el temps lliure de malaltia.





**Objectius**



**Objectiu principal**

Avaluar els efectes del tractament amb cetuximab després de la radioteràpia i millorar el coneixement dels mecanismes biològics involucrats utilitzant un model preclínic que simula un esquema d'adjuvència en malalts tractats amb radioteràpia i cetuximab.

**Objectius específics**

1. Avaluar *in vivo* si el manteniment amb cetuximab augmenta el temps lliure de malaltia (progressió) en xenoempelts procedents de la injecció de cèl·lules supervivents al tractament *in vitro* amb radiació ± cetuximab.
2. Determinar el paper antiangiogènic de cetuximab sobre els xenoempelts en diferents estadis del creixement tumoral.
3. Analitzar *in vitro* l'expressió de gens implicats en angiogènesi, supervivència i proliferació cel·lular.
4. Analitzar en els xenoempelts l'expressió de gens implicats en angiogènesi, supervivència i proliferació cel·lular.
5. Avaluar *in vitro* l'efecte de cetuximab en relació a possibles canvis en la dosi gènica.



# **Materials i mètodes**



## 1. CULTIUS CEL·LULARS

### 1.1. Cèl·lules A431

En aquest treball s'ha utilitzat la línia cel·lular A431, obtinguda de l' ATCC (*American Type Cell Culture*, nº CRL-1555) i que va ser establerta a partir d'un carcinoma escamós humà originat en la regió vulvar. Un elevat nombre d'estudis centrats en el bloqueig d'EGFR s'han realitzat amb aquesta línia ja que en sobreexpressar-lo la converteix en un bon model per a l'estudi de teràpies anti-EGFR, ja sigui amb anticossos monoclonals o amb inhibidors de l'activitat tirosina quinasa intracel·lular.

### 1.2. Condicions de cultius

Les cèl·lules A431 van créixer formant una monocapa cel·lular amb morfologia epitelial adherida a la superfície del suport plàstic en el qual es van cultivar. Les cèl·lules es van mantenir de forma rutinària amb DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, BioWhittaker) suplementat amb un 10% de FBS (sèrum fetal boví, PAA Laboratories GmbH), 100 U/mL de penicil·lina, 100 U/mL d'estreptomicina i 15 mM d'HEPES (aquests 3 components es van obtenir de Gibco BRL Life Technologies) en un incubador a 37°C en una atmosfera saturada de vapor i amb una concentració de CO<sub>2</sub> del 5%. Es van deixar créixer fins un 90% de confluència, canviant el medi segons les necessitats del cultiu (cada 3 o 4 dies).

### 1.3. Procés de tripsinització

Una vegada les cèl·lules van arribar a la confluència desitjada, es van rentar dues vegades amb PBS (tampó fosfat salí, PAA Laboratories GmbH) i es van tripsinitzar amb 500 mg/L de tripsina 1:250 i 200 mg/L d'EDTA (BioWhittaker) durant 15-20 minuts a 37°C. La reacció de tripsinització es va aturar afegint a la placa de cultiu medi complet en una relació 1:3. Amb una pipeta Pasteur de plàstic es va transferir la suspensió cel·lular a un tub cònic estèril, guardant una petita alíquota per a realitzar el comptatge de cèl·lules. Seguidament es va centrifugar el tub a 1000 g durant 5 minuts, es va eliminar el sobrenedant i es va ressuspendre el *pellet* en medi complet per tal de sembrar nous subcultius.

### 1.4. Recompte del nombre de cèl·lules

En aquest treball es va utilitzar el mètode de recompte directe de cèl·lules amb un hemocitòmetre (o cambra de Neubauer) el qual permet, en qualsevol moment del cultiu, comptar el nombre de cèl·lules i conèixer-ne la seva viabilitat. Aquesta tècnica es va realitzar

de manera rutinària en el manteniment dels cultius cel·lulars i en els diferents assaigs per sembrar el nombre adequat de cèl·lules a les plaques de cultiu. En general, a partir d'una alíquota obtinguda en el procés de tripsinització es fa una dilució amb el colorant blau de tripà, de manera que es puguin comptar unes 100 cèl·lules per quadrat de la cambra de Neubauer. El blau de tripà penetra a l'interior de les cèl·lules únicament quan la membrana cel·lular està deteriorada, per aquest motiu les cèl·lules vives s'observen com esferes refringents i clares, mentre que les mortes s'observen opaques i tenyides de blau.

En aquest estudi el recompte de cèl·lules es va realitzar sota el microscopi invertit, diferenciant les cèl·lules vives de les mortes, a cadascun dels 4 o 8 quadrants de l'hemocitòmetre. El càlcul de cèl·lules per mL es va realitzar aplicant la següent fórmula:

$$\text{Nº cèl·lules / mL} = \text{promig del nº de cèl·lules viables per quadrat} \times \text{dilució} \times 1 \cdot 10^4$$

essent  $1 \cdot 10^4$  el factor de correcció del volum.

La viabilitat es va calcular dividint el número de cèl·lules vives pel total de cèl·lules comptades i multiplicant per 100. Finalment, les cèl·lules es van ressuspendre en els mL de medi necessaris per a portar les cèl·lules del cultiu a la concentració desitjada.

### **1.5. Congelació i descongelació de les cèl·lules**

Per a la congelació de les cèl·lules, es van tripsinitzar tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, i, una vegada obtingut el *pellet*, es va ressuspendre en medi de congelació constituït per un 90% de FBS i un 10% de l'agent crioprotector DMSO (Dimetilsulfòxid, Sigma). La suspensió es va aliquotar en criotubs i es van congelar en un tanc d'alcohol isoamílic, que col·locat a  $-80^{\circ}\text{C}$  disminueix la temperatura progressivament. Transcorregudes 4h, les cèl·lules ja estaven a punt per a ser emmagatzemades en el tanc de nitrogen líquid.

Per a la descongelació, les cèl·lules es van passar del tanc de nitrogen líquid a un bany a  $37^{\circ}\text{C}$  per a que la descongelació fos ràpida. A continuació la suspensió cel·lular es va abocar a una placa de cultiu amb medi complert preincubat a  $37^{\circ}\text{C}$ . A les 16h les cèl·lules estaven majoritàriament adherides i es feia un canvi de medi per a eliminar les cèl·lules mortes i el DMSO present en el medi de congelació.



### 1.6. Control de micoplasma en els cultius

La contaminació per micoplasma passa visualment desapercebuda en els cultius i en pot afectar els resultats experimentals. Per evitar aquesta font de confusió, es va efectuar rutinàriament la detecció de micoplasma. Aquest test està basat en la detecció del microorganisme per PCR amb els *primers* o encebadors Mico-1 i Mico-2 (Taula 2). Per a la realització de la PCR es van utilitzar els sobredants de cultius confluents en absència d'antibiòtics.

**Taula 2. Seqüència aminoacídica dels *primers* utilitzats per la detecció de micoplasma.**

<b>Primers</b>	<b>Seqüència aminoacídica (5' 3')</b>
Mico-1	ggcgaatgggtgagtaacacg
Mico-2	cggataacgcttgcgactatg

## 2. TRACTAMENT DE LES CÈL·LULES *IN VITRO*

### 2.1. Agents utilitzats

#### 2.1.1. Radiació ionitzant

Les cèl·lules, ben oxigenades i a temperatura ambient, es van irradiar amb fotons de 6 MV procedents d'un accelerador lineal emprat pel tractament de pacients (Clinac 600, Varian) (Figura 6A) a una taxa de dosi de 2,7 Gy/min. La dosimetria va ser validada pel servei de Física Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia. Es va utilitzar un gruix d'1 cm de metacrilat per mantenir l'equilibri electrònic (Figura 6B).



Figura 6. (A) Accelerador lineal i (B) suport de metacrilat emprats per la irradiació de les cèl·lules.

#### 2.1.2. Cetuximab

Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>, Merck KGaA) va ser obtingut de la Farmàcia de l'Institut Català d'Oncologia. El fàrmac es va dissoldre fins a les concentracions adequades en medi complet abans de cada experiment i es va conservar a 4°C fins el moment del seu ús.

## 2.2. Obtenció i generació de la subpoblació cel·lular supervivent al tractament. Concepte de malaltia microscòpica residual

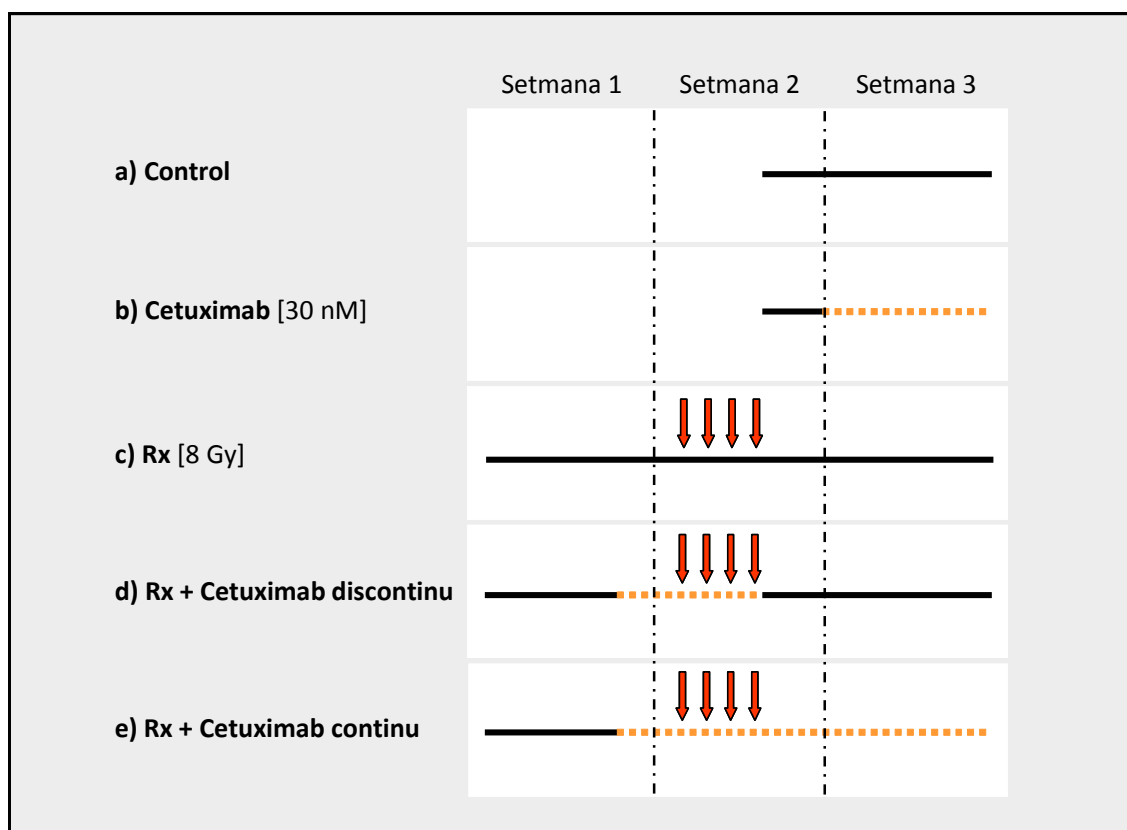
La malaltia microscòpica residual (MMR) en oncologia és la principal causa de recaiguda de malalts amb càncer, i es defineix com la persistència d'un petit nombre de cèl·lules malignes amb capacitat clonogènica per a repoblar un tumor (i/o formar metàstasi) després d'un tractament oncològic.

Es van dissenyar una sèrie d'experiments on el tractament dels cultius amb cetuximab, radiació o ambdós induís una subpoblació de cèl·lules supervivents que simulessin la MMR a la clínica. Aquesta fracció de cèl·lules va ser la que es va injectar posteriorment a ratolins atímics per a la generació de xenoempelts.

Es van sembrar  $2 \times 10^6$  de cèl·lules A431 en plaques de 15 cm de diàmetre i es van tractar els cultius amb radiació, cetuximab o ambdós segons l'esquema que es detalla a continuació (Figura 7):

- a) **Control:** es va mantenir el cultiu sense cap tractament.
- b) **Cetuximab:** es va mantenir el cultiu amb cetuximab 30 nM.
- c) **Radiació (Rx):** es va irradiar el cultiu amb una dosi total de 8 Gy, en fraccions consecutives 2 Gy cada una separades per 24 hores.
- d) **Tractament combinat discontinu:** es va mantenir el cultiu amb cetuximab 30 nM i es va irradiar amb una dosi total de 8 Gy, a raó d'una fracció de 2 Gy durant 4 dies consecutius. Es va retirar cetuximab del medi després de l'última dosi de radiació.
- e) **Tractament combinat continu:** es va mantenir el cultiu amb cetuximab 30 nM i es va irradiar amb una dosi total de 8 Gy, a raó d'una fracció de 2 Gy durant 4 dies consecutius.

Es va realitzar un canvi de medi dels cultius cada 3,5 dies. Degut a que no es van tripsinitzar les cèl·lules durant tot el tractament, les branques control (a) i cetuximab (b) van estar en cultiu durant 10 dies per evitar la seva degeneració, en comptes dels 21 dies de les branques c, d i e.



**Figura 7.** Esquema de tractament *in vitro* per l'obtenció de cèl·lules corresponents a malaltia microscòpica residual. Les cèl·lules es van tractar amb radiació, cetuximab o una combinació d'ambdós durant 10 dies (a, b) o 21 dies (c, d, e). Les sagetes indiquen fraccions de 2 Gy administrades en intervals de 24 hores i les línies discontinúes l'exposició continuada de cetuximab.

### 2.2.1. Determinació de l'eficiència de clonació (CE) i de la fracció supervivent (SF): assaig clonogènic

L'avaluació de l'efecte citotòxic dels tractaments i la quantificació de la fracció de cèl·lules supervivents es va realitzar mitjançant l'assaig clonogènic. Aquesta tècnica es basa en la capacitat que tenen algunes cèl·lules tumorals sembrades de forma aïllada de produir una ampla família de descendents. Aquelles que formin colònies visibles a simple vista (agrupacions de més de 50 cèl·lules filles) es consideren cèl·lules supervivents al tractament. Les colònies es poden quantificar prèvia tinció amb algun colorant. L'habilitat per formar colònies ens dona una idea del potencial tumorigènic d'una cèl·lula.

En el nostre estudi es van sembrar 5000 cèl·lules en plaques de 6 cm per triplicat. En aquest punt, es va considerar important que la tripsinització fos molt bona (sense agregats) per tal de sembrar cèl·lules aïllades, tant per la formació de colònies a partir d'una sola cèl·lula inicial com per sembrar exactament el mateix nombre en tots els esquemes de tractament. Les

plaques es van deixar a l'incubador a 37°C durant 14 dies sense canviar el medi ni moure-les. Transcorregut aquest temps es van tenyir les colònies amb el colorant cristall violeta (25% àcid acètic glacial, 75% etanol i 1% cristall violeta) durant 20 minuts. L'excés es va rentar amb aigua de l'aixeta.

La proporció de cèl·lules supervivents, equivalent al concepte de MMR, es va mesurar a través de l'eficiència de clonació (CE, *cloning efficiency*) i es va calcular segons la fórmula:

$$\mathbf{CE} = \text{n}^{\circ} \text{ de colònies comptades} / \text{n}^{\circ} \text{ de cèl·lules sembrades}$$

Tanmateix, la supervivència cel·lular (SF, *surviving fraction*) es va definir de la següent manera:

$$\mathbf{SF} = \text{CE cèl·lules tractades} / \text{CE cèl·lules no tractades}$$

### 3. TRACTAMENT *IN VIVO*

#### 3.1. Animals i estabulació

Els ratolins utilitzats en aquest treball van ser ratolins atímics swiss nu/nu mascles de 6-8 setmanes d'edat i 18-22 grams de pes (Harlan). Els animals es van mantenir a una temperatura de 20-22°C, en sales lliures de patògens i estabulats en gàbies autoclavables al servei d'estabulari de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL). Se'ls va proporcionar menjar i beguda estèril *ad libitum*. Tots els experiments van ser duts a terme en cabines de fluxe laminar vertical, i els procediments van ser avaluats i aprovats pel comitè ètic d' experimentació animal.

#### 3.2. Generació de xenoempelts a partir de la injecció de malaltia microscòpica residual

Els ratolins atímics, congènitament deficitaris en cèl·lules T, s'utilitzen en el camp de la recerca oncològica ja que no generen rebuig quan són trasplantats amb cèl·lules o tumors d'origen humà. Els xenoempelts procedents de línies cel·lulars humanes crescuts en aquests ratolins tenen un estroma murí però la part tumoral és humana. D'aquesta manera, mitjançant tècniques de biologia molecular es pot estudiar l'acció antitumoral d'una substància i discernir entre si és un efecte directe (sobre les pròpies cèl·lules tumorals) o bé indirecte (sobre les cèl·lules de l'estroma).

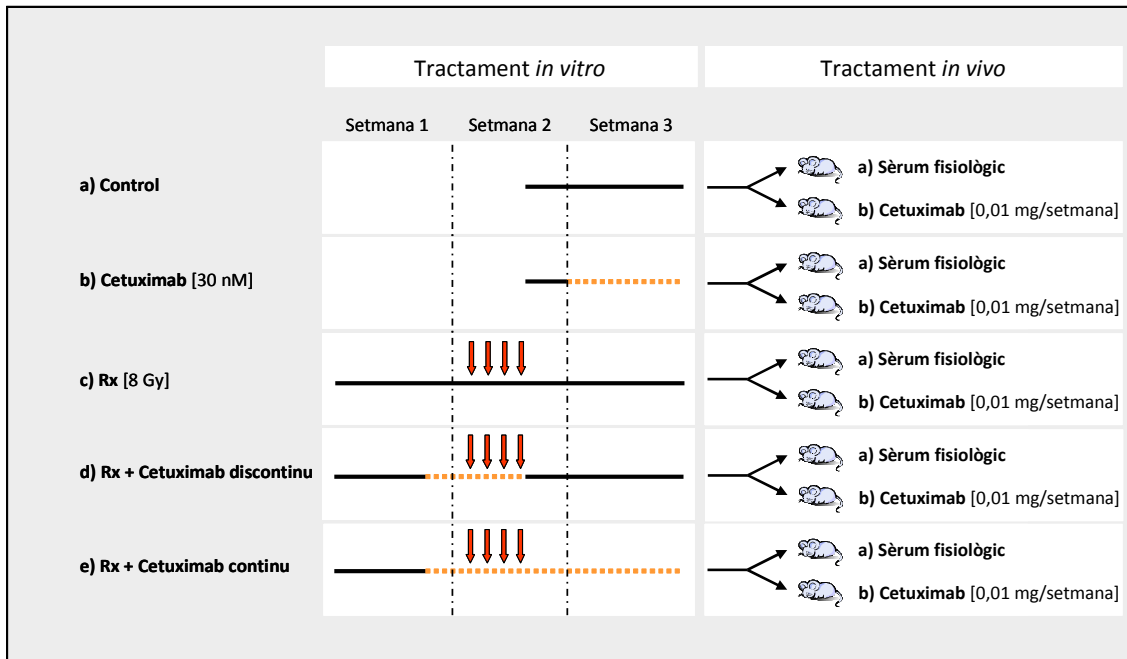
##### 3.2.1. Tractament dels animals

Per generar tumors a partir de MMR, es va injectar el mateix número de cèl·lules clonogèniques en el teixit subcutani dels ratolins atímics i per triplicat. Les cèl·lules es van injectar resuspeses en medi DMEM sense FBS en un volum de 100 µL.

Els ratolins van ser distribuïts de manera aleatòria en 2 grups de tractament *in vivo* (Figura 8):

- a) **grup control:** es van administrar intraperitonealment 450 µL de sèrum fisiològic cada 3,5 dies.
- b) **grup cetuximab:** es van administrar intraperitonealment 450 µL de sèrum fisiològic amb 0,05 mg de cetuximab cada 3,5 dies. Per tal de saturar els nivells de receptors d'EGF no associats a tumor es va administrar 0,1 mg de cetuximab 3,5 dies previs a la injecció subcutània de les cèl·lules.

Per cada esquema de tractament *in vitro* (a→e), es van realitzar un total de 6 experiments *in vivo* on el criteri de punt final es va establir quan el tumor assolia una mida d' 1 cm<sup>3</sup>, i 3 experiments addicionals on el punt final venia donat quan el tumor assolia una mida de 100 mm<sup>3</sup>. En aquest moment es va procedir al sacrifici del ratolí i al processat del xenoempelt per a la realització d'estudis histològics i bioquímics.



**Figura 8. Esquema de tractament *in vivo* i origen de les cèl·lules injectades per a l'obtenció dels xenoempelts.** Les cèl·lules es van tripsinitzar després del tractament *in vitro* i es va injectar el mateix nombre de cèl·lules clonogèniques a ratolins atòmics. Els animals es van randomitzar pel tractament amb sèrum fisiològic o amb 0,05 mg de cetuximab cada 3,5 dies (0,01 mg/setmana). El grup tractat amb cetuximab va rebre una dosi addicional de 0,1 mg de cetuximab 3,5 dies previs a la injecció de les cèl·lules.

### 3.3. Mesura del creixement tumoral

Per tal d'avaluar el paper adjuvant de cetuximab, es va mesurar el volum tumoral dels xenoempelts cada 3,5 dies, coincidint amb els períodes d'administració del fàrmac. El volum va ser calculat segons la fórmula:

$$V = [(diàmetre gran) \times (diàmetre petit)^2] \times \pi/6$$

Per quantificar amb precisió les variacions en el creixement tumoral induïdes pel tractament vam representar cada corba de creixement per separat sobre un eix de coordenades cartesianes. Això ens va permetre conèixer per cada tumor el moment en què un

determinat volum de 100, 200, 300 etc fins a 1000 mm<sup>3</sup> era assolit, per, finalment, fer la corresponent estadística.

#### **3.4. Obtenció i processat de les mostres tumorals**

Una vegada els xenoempelts van arribar al volum desitjat es van extirpar els tumors. Aquests es van criopreservar de dues maneres diferents. Per als estudis histològics es va congelar la meitat del tumor en medi de preservació OCT (<11% alcohol polyvinyl, <5% cera carbònica i <85% d'ingredients no reactius) i es va guardar a -80°C. La resta del tumor es va guardar en criotubs, també a -80°C, per a l'extracció d' RNA.



## 4. ESTUDIS HISTOLÒGICS DE LES MOSTRES TUMORALS

Els estudis histològics es van realitzar a partir dels tumors congelats en OCT. En tots els casos, es va utilitzar un criostat per a realitzar talls de 3 µm de gruix que es van col·locar sobre portaobjectes tractats prèviament amb 10% de poli-L-lisina. Una vegada adherits els talls sobre el portaobjectes es van deixar assecar durant 10 minuts a temperatura ambient i seguidament es van congelar a -20°C.

Es van utilitzar diferents tècniques histològiques d'immunotinció. Es va realitzar la immunohistoquímica del marcador endotelial CD31 per a la quantificació dels vasos sanguinis i del marcador F4/80 per a la quantificació de macròfags. La immunofluorescència es va utilitzar per al marcatge de Ki67 i caspasa-3 per a la quantificació de la proliferació i apoptosi cel·lular, respectivament. En tots els casos es van descongelar els portaobjectes i es van deixar temperar durant 20 minuts a temperatura ambient abans de realitzar la tècnica histològica.

### 4.1. Immunohistoquímica

Les seccions es van fixar amb formol tamponat al 4% durant 10 minuts i es van rentar amb aigua destil·lada i PBS 1X (0,15 M NaCl, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Es van permeabilitzar les membranes cel·lulars amb 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X durant 10 minuts. Per tal d'inhibir les peroxidases endògenes es van incubar els talls durant 10 minuts amb aigua oxigenada al 3% (67% PBS 1X, 30% metanol i 3% aigua oxigenada) i es van tornar a rentar amb aigua destil·lada i 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X. El bloqueig es va realitzar durant 1 hora a temperatura ambient amb sèrum de cabra-cavall 1/5 en PBS 1X, en el cas de CD31, i amb sèrum de cabra-cavall 1:1 (v:v) en el cas de F4/80. Després de la incubació amb l'anticòs primari (Taula 3) durant 1 hora a temperatura ambient es va procedir a rentar les seccions amb 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X i a la incubació amb l'anticòs secundari biotinitat (Taula 3) durant 1 hora a temperatura ambient.

**Taula 3. Anticòsos primaris i secundaris utilitzats per immunohistoquímica.**

Anticòs	Tipus	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
CD31	Primari	BDPharmigen	Monoclonal de rata	1:50
F4/80	Primari	AbD Serotec	Monoclonal de rata	1:50
Anti-rata biotinitat	Secundari	Dako	Policlonal de conill	1:200

Després de rentar amb 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X es van incubar els talls amb streptavidina i peroxidasa biotinilada procedents del kit *StreptABCComplex/HRP kit* (Dako) durant 30 minuts a temperatura ambient. El revelat es realitza mitjançant un sistema cromògen amb diaminobenzidina (DAB) i aigua oxigenada, de manera que quan aquest s'oxida forma un producte final de color marró en la zona de l'antigen diana. Seguidament es realitza una tinció amb hematoxilina i una deshidratació seguint una bateria d'etanols de menor a major graduació finalitzant amb xil·lol. El muntatge es realitza amb medi de resina sintètica DPX (dibutil flalat, BDH).

#### **4.1.1. Estudi i quantificació de la densitat vascular (CD31)**

L'antigen CD31 (PECAM-1) és una proteïna integral de membrana de 130 KDa que media l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i és un marcador específic de cèl·lules endotelials madures, les quals recobreixen la paret dels vasos sanguinis. La quantificació es va realitzar pel mètode descrit per Weidner i col·laboradors (Weidner et al., 1993) mitjançant microscòpia òptica en aquelles regions tumorals que presentaven un major nombre de capil·lars. Després d'examinar la mostra amb un objectiu de baix augment (x10) es van seleccionar 5 àrees amb major nombre de vasos tenyits. En cada una de les àrees i utilitzant un objectiu de més augments (x40), es comptaven el nombre de vasos presents. Es consideraven vasos sanguinis (1) aquelles estructures formades per diverses cèl·lules amb llum al seu interior, (2) una única cèl·lula tenyida i (3) un conjunt de cèl·lules tenyides. La quantificació de la densitat vascular es va dur a terme per inspecció directa, sense saber en cap moment quin tractament previ havien rebut els tumors.

#### **4.1.2. Estudi i quantificació dels macròfags (F4/80)**

L'antigen F4/80 és una glicoproteïna de membrana de 160 KDa que s'expressa específicament en macròfags. La quantificació es va realitzar mitjançant microscòpia òptica en aquelles regions tumorals que presentaven un major nombre de macròfags. Després d'examinar la mostra amb un objectiu de baix augment (x10) es van seleccionar 5 àrees amb major nombre de macròfags tenyits. En cada una de les àrees i utilitzant un objectiu de més augments (x40), es comptava el nombre present d'aquestes cèl·lules. La quantificació del nombre de macròfags es va dur a terme per inspecció directa, sense saber en cap moment quin tractament previ van rebre els tumors.

## 4.2. Immunofluorescència

Les seccions es van fixar amb formol tamponat al 4% durant 10 minuts i es van rentar amb aigua destil·lada i PBS 1X (0,15 M NaCl, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Es van permeabilitzar les membranes cel·lulars amb 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X durant 10 minuts. El bloqueig es va realitzar durant 1 hora a temperatura ambient amb sèrum de cabra-cavall 1/5 en PBS 1X, en el cas de Ki67, i amb 1% d'albumina en PBS 1X en el cas de caspasa-3. Després de la incubació amb l'anticòs primari (Taula 4) durant 1 hora a temperatura ambient es va procedir a rentar les seccions amb 0,1% de Tritó X-100 en PBS 1X i es va incubar amb l'anticòs secundari corresponent (Taula 4) durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment es van muntar i contrastar els nuclis amb medi de muntatge Vectashield amb el colorant fluorescent DAPI, que s'uneix específicament al DNA (Vector Laboratories Inc.).

**Taula 4. Anticòsos primaris i secundaris utilitzats per immunofluorescència.**

Anticòs	Tipus	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
Ki67	Primari	NeoMarkers	Policlonal de conill	1:100
Caspasa-3	Primari	Cell Signaling	Policlonal de conill	1:500
Alexa fluor 594 anti-conill	Secundari	Invitrogen	Cabra	1:200

### 4.2.1. Estudi i quantificació de la proliferació cel·lular (Ki67)

L'antigen Ki67 és una proteïna nuclear de 345-395 KDa que s'expressa en les cèl·lules en proliferació en fase G1, S i G2, amb uns nivells més alts presents en la fase M. No s'expressa durant la fase G0 del cicle cel·lular. Per aquest motiu Ki67 és el marcador per excel·lència de proliferació cel·lular. Després d'examinar la mostra amb un objectiu de baix augment (x10) es van seleccionar 5 àrees amb major número de cèl·lules positives. Es va procedir a capturar les imatges amb un microscopi de fluorescència equipat amb una càmera acoblada i amb el software SPOT advance (Diagnostic Instruments). La quantificació del marcatge es va dur a terme mitjançant el software ImageJ, que es pot trobar a la web [www.rsb.info.nih.gov/ij/](http://www.rsb.info.nih.gov/ij/). Es van comptar els nuclis de les cèl·lules tumorals positives respecte al total de nuclis en cada camp. El comptatge es va dur a terme a ull cec, sense saber en cap moment quin tractament previ van rebre els tumors. L'índex de proliferació (o índex Ki67) es va determinar a partir de la proporció de cèl·lules Ki67 positives respecte del número total de cèl·lules.

### 4.2.2. Estudi i quantificació de l'apoptosi cel·lular (caspasa-3)

La caspasa-3 és una de les proteïnes clau en l'execució de l'apoptosi. La seva aparició

en el citoplasma de les cèl·lules que entren en apoptosi és un fenomen precoç i precedeix a l'aparició dels canvis morfològics propis de la mort cel·lular. Per això caspasa-3 és un bon marcador de mort cel·lular per apoptosi. Després d'examinar la mostra amb un objectiu de baix augment (x10) es van seleccionar 5 àrees amb major número de cèl·lules positives. Es va procedir a capturar les imatges amb un microscopi de fluorescència equipat amb una càmera acoblada i amb el *software SPOT advance*. La quantificació del marcatge es va dur a terme mitjançant el *software ImageJ*. Es van comptar els nuclis de les cèl·lules tumorals positives respecte al total de nuclis en cada camp. El comptatge es va dur a terme per inspecció directa, sense saber en cap moment quin tractament previ van rebre els tumors. L'índex apoptòtic es va determinar a partir de la proporció de cèl·lules caspasa-3 positives respecte del número total de cèl·lules.

## 5. ESTUDIS BIOQUÍMICS

### 5.1. Senyalització cel·lular. Estimulació de la MAPK ERK 1/2

Per avaluar l'activació de la via de les MAPK es va utilitzar la tècnica de Western Blot. Es van quantificar les proteïnes ERK fosforil·lades en llistats cel·lulars procedents de cèl·lules tractades en diferents condicions.

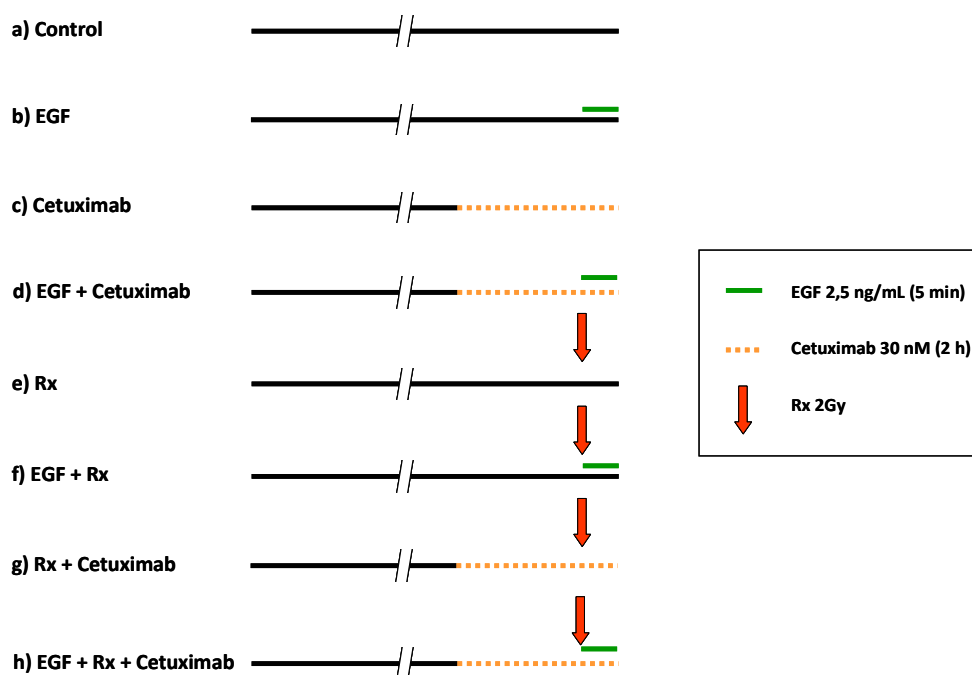
#### 5.1.1. Tractament dels cultius

Es van tractar les cèl·lules amb EGF, radiació, cetuximab o una combinació d'aquests per tal d'avaluar el seu efecte sobre la proliferació cel·lular. Es van realitzar 2 esquemes de tractament diferents:

##### Esquema 1

Es van sembrar 600.000 cèl·lules A431 en plaques de 6 cm de diàmetre amb medi complet i es van deixar créixer durant 72 hores. Transcorregut aquest temps es van mantenir amb 0,5% FBS durant 24 hores, moment en que es van tractar de la següent manera (Figura 9):

- a) **Control:** es va mantenir el cultiu sense cap tractament.
- b) **EGF:** es va afegir EGF 2,5 ng/mL durant 5 minuts.
- c) **Cetuximab:** es va afegir cetuximab 30 nM durant 2 hores.
- d) **EGF + cetuximab:** es va afegir cetuximab 30 nM durant 2 hores més EGF 2,5 ng/mL durant els 5 últims minuts.
- e) **Radiació (Rx):** es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 2 Gy i seguidament es va incubar a 37°C durant 5 minuts.
- f) **EGF + Rx:** es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 2 Gy i seguidament es va incubar a 37°C amb EGF 2,5 ng/mL durant 5 minuts.
- g) **Rx + cetuximab:** es va afegir cetuximab 30 nM durant 2 hores, es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 2 Gy i seguidament es va incubar a 37°C durant 5 minuts.
- h) **EGF + Rx + cetuximab:** es va afegir cetuximab 30 nM durant 2 hores, es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 2 Gy i seguidament es va incubar a 37°C amb EGF 2,5 ng/mL durant 5 minuts.



**Figura 9. Esquema de tractament de les cèl·lules A431 per a l'estudi d'activació de la MAPK ERK 1/2.** Transcorregudes 72 hores, els cultius es van mantenir 24 hores addicionals amb DMEM amb 0,5% de FBS. Les cèl·lules es van tractar amb EGF, cetuximab, radiació o una combinació d'aquests.

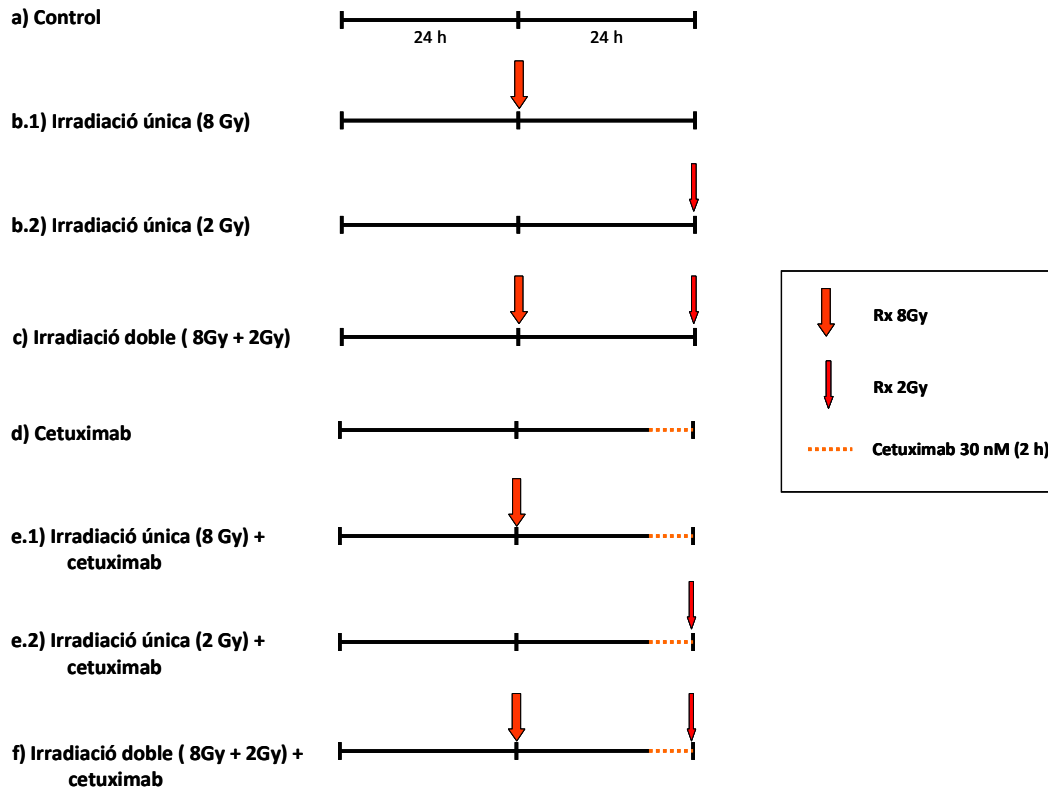
Els llisats cel·lulars es van obtenir transcorregudes les 2 hores del tractament amb cetuximab i 5 minuts posteriors a la irradiació i a l'exposició a EGF.

### Esquema 2

Es van sembrar  $1,5 \times 10^6$  cèl·lules A431 en plaques de 6 cm de diàmetre amb medi amb 0,5% FBS i es van deixar créixer durant 24 hores abans de l'aplicació de qualsevol tractament. Els cultius es van tractar com es detalla a continuació (Figura 10, a-c):

- a) **Control:** es va mantenir el cultiu sense cap tractament.
- b) **Irradiació única:**
  - b.1) es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 8 Gy.
  - b.2) es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 2 Gy.
- c) **Irradiació doble:** es va irradiar el cultiu amb una dosi de 8 Gy. Addicionalment, es va administrar una segona dosi de 2 Gy a les 24 hores posteriors a la primera dosi.

Aquest esquema es va repetir en absència i presència de cetuximab 30 nM durant 2 hores prèvies a la irradiació amb 2 Gy (Figura 10, d-f). Els llisats cel·lulars es van obtenir transcorregudes les 2 hores del tractament amb cetuximab i 5 minuts posteriors a la irradiació.



**Figura 10. Esquema de tractament de les cèl·lules A431 per a l'estudi d'activació de la MAPK ERK 1/2.** Els cultius es van mantenir amb 0,5% de FBS. Es van irradiar amb una dosi única de 8 Gy a les 24 h de la sembra (b.1), de 2 Gy a les 48 h b.2) o ambdues (c). Es va repetir el mateix esquema en presència de cetuximab 30 nM durant 2 hores prèvies a la última irradiació (d-f).

## 5.1.2. Western blot

### 5.1.2.1. Extracció de proteïnes

L'extracció de proteïnes es va realitzar a 4°C i a partir dels cultius cel·lulars tractats amb radiació, cetuximab o una combinació d'aquests tal com s'ha descrit en l'apartat 5.1.1. Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1X i es van llisar durant 10 minuts en agitació amb solució de lisis RIPA (150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% sodi deoxicolat, 0,1% SDS i 50 mM Tris pH 8), moment en què afegíem un ventall d'inhibidors de proteases (1 µg/mL leupeptina, 4 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL benzamidina i 1 µM PMSF) i de fosfatases (50 mM fluorur sòdic i 40 mM β-glicerolfosfat). Posteriorment, la monocapa cel·lular es va disgregar mecànicament i es va transferir la suspensió a un tub *ependorf*. El llisat es va centrifugar a 13.000 g durant 5

minuts a 4°C i el sobrenedant es va transferir a un nou tub *ependorf*. Es va agafar una petita alíquota per a la quantificació proteica i la resta es va conservar a -80°C.

#### 5.1.2.2. Quantificació de proteïnes

La quantificació de proteïnes de les mostres es va dur a terme amb el Kit *BCA protein assay kit* (Pierce Biotechnology) i seguint les instruccions del fabricant. En una placa de 96 pous es van col·locar 5 µL de mostra amb 15 µL d'aigua destil·lada i, seguidament, es van afegir 200 µL de solució de treball. Es va incubar la placa a 37°C durant 30 minuts i es va llegir en un espectrofotòmetre de plaques a una absorbància de 540 nm.

Totes les mostres es van analitzar per duplicat i en cada quantificació es va incloure, també per duplicat, una recta patró amb concentracions conegudes d'albumina sèrica bovina (BSA) per a poder extrapolar la concentració proteica de cada mostra.

#### 5.1.2.3. Preparació de les mostres

Es va barrejar la mateixa quantitat de proteïnes de cada mostra amb tampó de mostra 4x (0,25 M Tris HCl pH 6,8, 0,3 M SDS, 40% glicerol, 0.01 % blau de bromofenol i 5% β-mercaptoetanol) i es va incubar a 95°C durant 5 minuts per a dur a terme la desnaturalització. Sempre es va carregar la mateixa quantitat de proteïna (30 µg) en cada carril dels gels.

#### 5.1.2.4. Electroforesi en gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE)

L' SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) és una tècnica àmpliament utilitzada en el camp de la biologia molecular per a separar les proteïnes segons la seva mobilitat electroforètica, que ve donada principalment pel seu pes molecular. El detergent aniònic SDS desnaturalitza les proteïnes i els hi confereix una càrrega negativa amb una proporció càrrega/massa uniforme, d'aquesta manera es pot assumir que la distància de migració en el gel depèn únicament del tamany de la proteïna.

Existeixen dos tipus de gels d'acrilamida/bisacrilamida (29:1), el preparador o superior i el separador o inferior. Les funcions que realitzen són diferents. El gel preparador permet que les proteïnes es concentrin en una banda estreta abans d'entrar en el gel separador i n'augmenten la resolució al provocar que tota la mostra entri en la fase separadora al mateix temps. En primer lloc es va preparar el gel separador, que pot contenir un major o menor percentatge d'acrilamida en funció de si les proteïnes d'interès són de baix o alt pes molecular. Independentment d'aquest percentatge, se li afegia al gel 9,4 M Tris base pH 8,8, 0,1% SDS, 1%



APS i 0,1% TEMED. Una vegada polimeritzat, es va afegir el gel preparador que constava de 4% d'acrilamida, 125 mM de Tris base pH 6,8, 0,1% SDS, 1% APS i 0,1% TEMED. Finalment, es van carregar les mostres i es va realitzar la electroforesi a 100 V en tampó d'electroforesi 1X (25mM Tris base pH 8,6, 0,1 M glicina i 0,1% SDS).

#### 5.1.2.5. Transferència de proteïnes

Es van transferir les proteïnes del gel d'acrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa (GE Healthcare, *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane*) mitjançant un camp elèctric. El muntatge o sandvitx de la transferència es va realitzar sobre un suport de plàstic on, per ordre, es col·locava un filtre esponjós, paper whatman, el gel d'acrilamida en contacte amb la membrana de nitrocel·lulosa, paper whatman i un últim filtre esponjós. La transferència es va realitzar a 400mA durant 1h 30min en fred en tampó de transferència 1X (25mM Tris base pH 8,6, 0,1 M glicina i 20% metanol).

#### 5.1.2.6. Detecció immunològica amb anticossos específics

Una vegada finalitzada la transferència, es va bloquejar la membrana amb un 5% de llet en pols en TBS 1X (1 M Tris base, 0,3 M clorur sòdic) i es va incubar en agitació durant 1 hora a temperatura ambient. Seguidament es va incubar l'anticòs primari (Taula 5) en agitació durant tota la nit a 4°C. L'endemà, es van rentar les membranes amb 0,1% de Tritó X-100 en TBS 1X i es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent unit a peroxidasa (Taula 5) en agitació durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment, es va rentar la membrana amb 0,1% de Tritó X-100 en TBS 1X. La detecció de la senyal es va realitzar amb un mètode quimioluminiscent no radioactiu de revelat basat en l'oxidació del luminol per part de la peroxidasa que està unida a l'anticòs secundari (*ECL western blotting detection reagents and analysis systems*, Amersham Biosciences). Aquesta emissió va ser detectada amb una exposició entre 1 i 5 minuts amb films d'autoradiografia sensibles a la llum blava (*Hyperfilm ECL, high performance chemoluminescence film*, Amersham Biosciences).

**Taula 5. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per western blot.**

Anticòs	Tipus	Casa comercial	Origen	Dilució de treball
p-ERK 1/2	Primari	Sigma Aldrich	Monoclonal de ratolí	1:5000
Tubulina	Primari	Sigma Aldrich	Monoclonal de ratolí	1:5000
Anti-ratolí HRP	Secundari	Amersham	Ovella	1:5000

## 5.2. Secreció de VEGF-A

Per avaluar si la radiació o cetuximab induïen la secreció de VEGF es van determinar els seus nivells en el sobrenedant de cultius tractats amb diferents condicions.

### 5.2.1. Tractament dels cultius i obtenció de les mostres

Es van sembrar  $4 \times 10^6$  cèl·lules A431 per triplicat en plaques de 6 cm de diàmetre amb medi amb 0,5% FBS i es van deixar créixer durant 24 hores. Transcorregut aquest període, els cultius es van sotmetre als següents tractaments:

- a) **Control:** es va mantenir el cultiu sense cap tractament.
- b) **Cetuximab:** es va afegir cetuximab 30 nM al medi de cultiu.
- c) **Radiació (Rx):** es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 8 Gy.
- d) **Rx + cetuximab:** es va irradiar el cultiu amb una única dosi de 8 Gy i es va afegir cetuximab 30 nM al medi de cultiu.

Es va agafar una alíquota de sobrenedant de cada placa a les 0 h, 24 h i 48 h posteriors al tractament per a determinar els nivells de VEGF secretats al medi. Es van comptar el número de cèl·lules en cada moment del recull per a normalitzar els resultats en el moment de l'anàlisi. Les mostres es van guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el moment del seu ús.

### 5.2.2. ELISA

Per a la quantificació del VEGF secretat al medi per part de les cèl·lules tumorals en cultiu es va utilitzar el kit *Quantikine Human VEGF ELISA kit* (R&D Systems). Per a l'experiment es van utilitzar 15  $\mu\text{L}$  de mostra i la quantificació es va normalitzar segons el número de cèl·lules presents al cultiu en el moment de recollir el sobrenedant.

Es van utilitzar plaques comercials de 96 pous recoberts de l'anticòs monoclonal específic per al VEGF-A humà. Es va deixar incubar la placa 2 hores a temperatura ambient per tal que el VEGF-A present en les mostres s'unís a l'anticòs immobilitzat als pous. Després de rentar 3 vegades, es van afegir 200  $\mu\text{L}$  de l'anticòs anti-VEGF conjugat amb peroxidasa i es va tornar a incubar 2 hores a temperatura ambient. Seguidament, es va tornar a rentar i a incubar 20 minuts a temperatura ambient amb 200  $\mu\text{L}$  de tetrametilbenzidina. Aquesta substància reacciona colorimètricament amb la peroxidasa, per això és necessari incubar-ho evitant el contacte amb la llum. Finalment es va parar la reacció afegint 50  $\mu\text{L}$  de solució *Stop*, moment en que es va procedir a la lectura de la densitat òptica a 450 nm de longitud d'ona.

En cada experiment d'ELISA es va establir una corba estàndard seguint les instruccions del fabricant que anava de 0 a 2000 pg/mL per tal d'extrapolar els valors absoluts en les mostres. Totes les mostres i els punts de la corba estàndard van ser quantificats per duplicat i es va calcular la mitja de les rèpliques.

## 6. ESTUDIS D'EXPRESSION GÈNICA

### 6.1. Obtenció de les mostres

A més de la citotoxicitat dels tractaments també es van determinar els possibles canvis en l'expressió gènica induïts pels tractaments sobre les cèl·lules A431. En concret, es va investigar si s'havien produït modificacions en l'expressió de gens implicats en la via de senyalització de l'EGFR. Es va obtenir RNA de cèl·lules tractades segons els esquemes de la Figura 7, just abans de la injecció en els animals.

### 6.2. Extracció de l'RNA

L'extracció de l'RNA total es va realitzar amb *Trizol reagent* (Invitrogen), una solució monofàsica de fenol i guanidina d'isotiocianat, a partir de la MMR resultant del tractament *in vitro*. També es va realitzar a partir dels xenoempelts. A cada mostra se li va afegir 1 mL de Trizol i es va homogeneïtzar la barreja pipetejant repetidament per tal d'afavorir la lisi de les cèl·lules. En el cas dels xenoempelts es va disgregar manualment un fragment de 50-100 mg de pes. Seguidament es va deixar reposar en gel durant 15 minuts per a facilitar la dissociació dels complexos nucleo-proteics i posteriorment es va centrifugar a 13000 g a 4°C durant 15 minuts per a separar la fase aquosa (on es troba l'RNA) de la fase orgànica (DNA i proteïnes). Es va recuperar la fase aquosa i es va precipitar l'RNA afegint un volum d'isopropanol equivalent al de la fase aquosa recollida i es va mantenir durant 15 minuts a 4°C. Transcorregut aquest temps es va centrifugar la mostra a 13000 g durant 15 minuts per a recuperar l'RNA i es va procedir a fer 2 rentats amb etanol 75%. Per últim, es va deixar eixugar el *pellet* i es va ressuspensar en 100 µL d'aigua destil·lada.

### 6.3. Quantificació i determinació de la integritat de l'RNA

L'RNA es va quantificar per mitjà d'espectrofotometria a 260 nm en un espectrofotòmetre NanoDrop i la seva puresa es va determinar a través del quocient de l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. En una aproximació de la puresa, es considera que la relació  $A_{260} / A_{280}$  ha de ser superior a 2. La seva integritat es va determinar per electroforesi en gel d'agarosa a l'1% tenyit amb BrEt, d'acord amb la qualitat de les bandes corresponents a l'RNA ribosomal.

#### 6.4. Retrotranscripció (RT) de l'RNA a cDNA

Aquesta tècnica consisteix en convertir l'mRNA a cDNA el qual és molt menys làbil i, per tant, és més senzill de manipular. Es van retrotranscriure 500 ng de RNA utilitzant *el kit First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche)*, fent servir Oligo-d(T)20 i seguint les instruccions del fabricant. El programa de retrotranscripció va consistir en 1h a 37°C, 5 minuts a 95°C per inactivar la retrotranscriptasa AMV (*avian myeloblastosis virus*) i un últim pas a 4°C durant 5 minuts. El cDNA resultant es va conservar a -80°C fins el moment del seu ús.

#### 6.5. Disseny dels primers

Donat que les mostres sobre les que hem treballat provenien de xenoempelts de ratolí, era important poder diferenciar entre el genoma humà i el murí. Per resoldre la qüestió de la diferenciació entre espècies es van dissenyar *primers*, basant-nos en la homologia entre seqüències humana i murina, per a cadascun dels gens d'estudi. Un cop alineades les seqüències mitjançant l'aplicació BLAST de la pàgina web del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)), es van buscar aquells punts de no homologia per al disseny dels *primers*, tenint en compte que la mida del fragment a amplicar no superés els 180 pb i que, preferiblement, els desaparellaments es donessin a l'extrem 5' del *primer*. D'altra banda, en tota extracció de RNA s'arrossega una proporció no menyspreable de DNA que podria interferir en la detecció de l'expressió gènica. Per evitar l'amplificació del DNA contaminant de la mostra, els *primers* es van col·locar en exons diferents contigus. Els *primers* i el tamany dels amplicons es descriuen en la Taula 6.

**Taula 6. Seqüència aminoacídica dels primers dissenyats per al reconeixement específic dels gens humans (h) i murins (m) i tamany de l'amplicó resultant.**

Gen	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Tamany amplicó (pb)
<i>h-B2M</i>	tgctcgcgctactctctct	tccattctctgctggatgac	89
<i>m-B2M</i>	cctgcagagttaagcatgcc	gtctcgatcccagtagacgg	59
<i>h-VEGF-A</i>	gcattggagccttgctctg	ccttcgtgatgattctgcct	96
<i>m-VEGF-A</i>	gcactggaccctggcttta	cacctcatgggacttctctgct	93
<i>h-TGF-α</i>	gacagctcgcctgttc	ctgggcagtcattaaaatgg	129
<i>m-TGF-α</i>	ggacagctcgctctgcta	tgggcacttgttgaagtga	127
<i>h-HIF-1α</i>	cgctggagacacaatcata	tttggcgtttcagcgggtg	171
<i>m-HIF-1α</i>	ccggcgacacccatcatc	gctttggagtttccgatgaa	168
<i>h-GAPDH</i>	ctccaccttgacgct	ctgttgctgtagccaa	93
<i>h-EGFR</i>	taaaaccggactgaaggag	actgctgactatgtcccg	130

## 6.6. Amplificació del cDNA per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)

La PCR quantitativa, juntament amb els xips de DNA, és la metodologia més moderna per a l'estudi de l'expressió gènica. Aquesta tècnica és similar a la de la PCR convencional amb la particularitat que s'ha de dur a terme en un termociclador que permeti la medicació de fluorescència a temps real després d'excitar un fluorocrom a la longitud d'ona apropiada. El sistema d'amplificació es va dur a terme mitjançant el fluorocrom SYBR<sup>®</sup> Green (Roche Molecular Biochemicals), que s'uneix al DNA de doble cadena de forma inespecífica, per això és important que les condicions de la PCR siguin astringents i que disposem de controls negatius de cada reacció. La tècnica es basa en que, una vegada unit el fluorocrom, la intensitat de la fluorescència incrementa proporcionalment al producte. D'aquesta manera és possible determinar la quantitat d'amplicons presents després de cada ronda d'amplificació ja que a mesura que aquesta va produint-se, s'incorporen més molècules de SYBR<sup>®</sup> Green, que emetran fluorescència i que podem detectar a temps real. Les lectures de fluorescència obtingudes ens donen un valor de Cp (*crossing point*). Aquest Cp és el cicle de la reacció a partir del qual l'emissió de fluorescència comença a incrementar de forma exponencial. Com més quantitat de cDNA motlle hi hagi a l'inici de la reacció, abans arribarà el seu Cp. Aquest valor es pot traduir en un resultat quantitatiu (número de còpies d'un amplicó i, per extensió, del gen del que en forma part) si construïm una recta patró a partir de dilucions seriades d'una concentració coneguda de cDNA. Aquesta recta s'ha de calcular per a cadascun dels gens d'estudi així com per al gen de referència. Els valors obtinguts després de l'extrapolació amb la recta patró es van normalitzar amb els valors del gen de referència, de manera que les mostres es poguessin comparar entre si.

És necessària la referència interna d'un gen que en teoria no presenti canvis en la seva expressió. Aquests gens són els anomenats *housekeeping genes*. Donada la controvèrsia sobre l'estabilitat en els nivells d'expressió d'aquests gens en diferents teixits i condicions experimentals, vam triar dos gens, *GAPDH* i *β-2-MICROGLOBULINA*. Així, si el quocient entre aquests dos gens es mantenia raonablement constant entre totes les mostres, podríem afirmar que ambdós es comportaven com a *housekeeping genes* i podríem utilitzar qualsevol dels dos com a gen de referència. En el nostre cas vam triar *GAPDH*.

Els experiments de qRT-PCR es van fer utilitzant el kit *LC FastStart DNA Master SYBR Green I Reagent set* (Roche), que conté tots els reactius necessaris (Taq DNA polimerasa, buffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> i SYBR<sup>®</sup> Green) en la plataforma LightCycler 480 (Roche). En el nostre cas es van amplificar els fragments de cDNA, d'humà i de ratolí, corresponents als gens *HIF-1α*,

*VEGF-A*, *TGF- $\alpha$* , *EGFR*, *GAPDH* i  *$\beta$ -2-MICROGLOBULINA* i es va quantificar el número de còpies presents de cada un dels gens en 2  $\mu$ L d'una dilució 1:10 del producte de RT, 5  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup> Green, el volum de primers corresponent en cada cas (Taula 7) i aigua destil·lada fins a un volum final de 10  $\mu$ L. Les condicions d'amplificació es resumeixen en la Taula 7. Els fragments amplificats van ser comprovats per tamany en un gel d'agarosa al 2%.

**Taula 7. Condicions utilitzades per a la quantificació dels gens per qRT-PCR.**

Producte amplificat	Barreja de reactius	Condicions d'amplificació
<i>h-B2M</i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,2 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 65 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles
<i>h-VEGF-A</i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,2 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 65 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles
<i>h-TGF-<math>\alpha</math></i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,15 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 62 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles
<i>h-HIF-1<math>\alpha</math></i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,2 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 65 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles
<i>h-GAPDH</i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,2 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 62 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles
<i>h-EGFR</i>	5 $\mu$ L SYBR <sup>®</sup> Green; 0,2 $\mu$ M primers; 2 $\mu$ L cDNA. Vol. Final 10 $\mu$ L	95 <sup>o</sup> C, 10 min;(95 <sup>o</sup> C, 10 s; 65 <sup>o</sup> C, 20 s; 72 <sup>o</sup> C, 13 s) x 55 cicles

## 6.7. Quantificació de l'expressió gènica

Per a determinar el número de còpies d'un mRNA específic en una mostra en concret s'ha d'establir una recta patró amb diferents concentracions conegudes de cDNA que serveixi com a referència. A partir de la recta patró es pot calcular la quantitat de mRNA dels gens a estudiar en cada mostra. Aquesta recta es va construir a partir del producte de PCR de cada gen clonat en un vector.

### 6.7.1. Amplificació dels fragments d'interès

Es van amplificar els fragments de DNA corresponents a *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF-A*, *TGF- $\alpha$* , *EGFR*, *GAPDH* i  *$\beta$ -2-MICROGLOBULINA* mitjançant una PCR convencional. Es va fer la barreja dels reactius com es detalla a la taula 8. El programa de PCR consistia en 95<sup>o</sup>C, 5 minuts; (95<sup>o</sup>C, 45 s; 55<sup>o</sup>C, 45 s; 72<sup>o</sup>C, 1 min) x 30 cicles i una elongació a 72<sup>o</sup>C durant 15 minuts. Els fragments amplificats van ser comprovats per mida en un gel d'agarosa al 2%.

**Taula 8. Condicions utilitzades per a l'amplificació dels fragments per PCR convencional.**

Producte amplificat	Barreja de reactius	Condicions d'amplificació
<i>h-B2M</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min
<i>h-VEGF-A</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min
<i>h-TGF-α</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min
<i>h-HIF-1α</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min
<i>h-GAPDH</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min
<i>h-EGFR</i>	1x Buffer; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 μM primers; 0,25 U Taq polimerasa i 100 ng DNA. Vol. Final: 25 μL	95°C, 5 min;(95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min) x 30 cicles; 72°C, 15 min

### 6.7.2. Clonatge de *B2M*, *GAPDH*, *HIF-1α*, *VEGF-A*, *TGF-α* i *EGFR* en un vector pCR4-TOPO

La Taq polimerasa poseix una activitat transferasa terminal independent de la presència de DNA motllo, que provoca l'addició d'una deoxiadenina en els extrems 3' dels productes de PCR. La tecnologia TOPO TA Cloning (Invitrogen) aprofita aquesta particularitat de la polimerasa i proporciona plàsmids linearitzats amb un residu protubernat deoxitimidina en 3'. Això permet que els fragments amplificats per PCR es lliguin de manera senzilla al vector. El vector pCR4-TOPO es caracteritza per contenir gens de resistència als antibiòtics ampil·lina i kanamicina.

#### 6.7.2.1. Lligació

Després d'amplificar els fragments de DNA corresponents a *HIF-1α*, *VEGF-A*, *TGF-α*, *EGFR*, *GAPDH* i *β2M*, es va dur a terme la lligació de 2 μL de cadascuna de les mostres amplificades amb 1 μL del vector seguint les instruccions del fabricant en un volum final de 10 μL.

#### 6.7.2.2. Transformació

Es van utilitzar 25 μL de bacteris *E.Coli* competents *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) i es van transformar seguint el protocol de xoc tèrmic recomanat per la casa



comercial. El volum de cada producte de lligació barrejat amb els bacteris va ser de 2,5 µL. Aquesta barreja es va mantenir en gel durant 30 minuts per a realitzar després un xoc tèrmic a 42°C durant 45 segons. Es va tornar a deixar en gel durant 2 minuts més. A continuació es van afegir 250 µL de medi ric SOC estèril (2% triptona, 0.5% extracte de llevadura, 10mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO i 20 mM glucosa) i es va deixar 1 h en agitació a 37°C. Seguidament es van sembrar 100 µL de cada transformació en plaques de LB (Luria-Bertani)-agar estèril (1% triptona, 0.5% extracte de llevadura, 1% NaCl, 1.5% agar, pH 7.5) suplementades amb kanamicina 30 µg/mL, que és l'antibiòtic escollit per a la selecció de colònies desitjades. Es van incubar les plaques durant tota la nit a 37°C en agitació. L'endemà es va tornar a realitzar un segon creixement de les colònies seleccionades, aquesta vegada en 3 mL de LB líquid suplementat amb kanamicina 30 µg/mL. D'aquest segon creixement és d'on es van obtenir els plasmidis.

#### 6.7.2.3. Extracció del DNA plasmídic

Per a la recuperació dels plasmidis es va fer servir el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen), que permet aïllar i purificar fins a 20 µg de DNA. Es va realitzar tot el procés seguint les instruccions del fabricant. Finalment, es va fer una PCR de comprovació per saber si el fragment s'havia introduït correctament després de la lligació. Les condicions van ser les mateixes que les descrites en l'apartat 7.6.1.

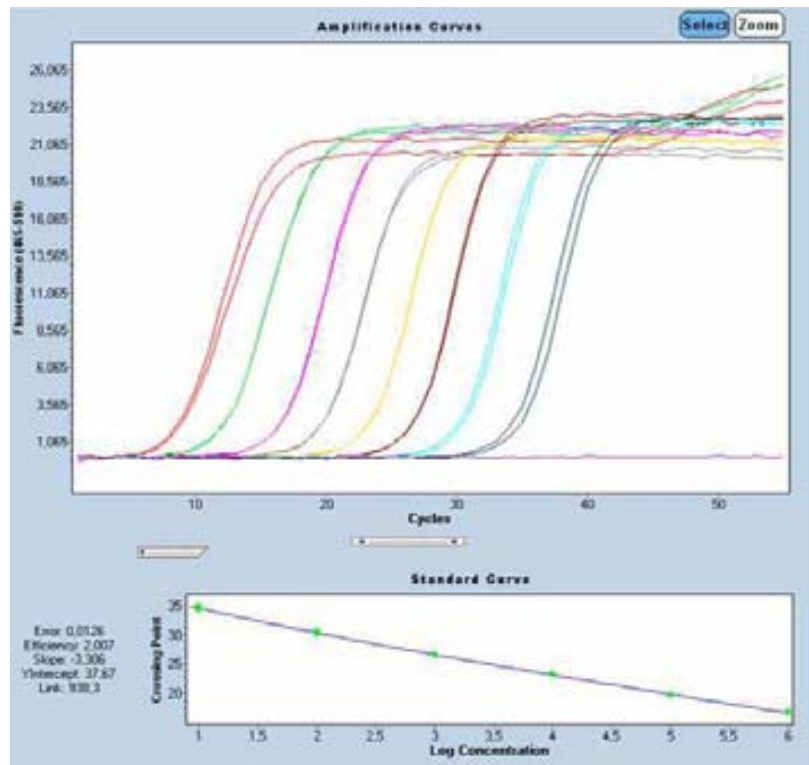
#### 6.7.3. Recta patró

Es va calcular el número de molècules de vector recuperades després de la purificació a partir de la concentració de DNA determinada per espectrofotometria i de la mida (pb) de la construcció a través de la fórmula:

$$\frac{X \text{ ng}}{\mu\text{L}} \square \frac{1 \text{ g}}{1 \times 10^9 \text{ ng}} \square \frac{1 \text{ mol}}{[pb(\text{plàsmid} + \text{fragment})] \square 660 \text{ g / pb}} \square \frac{6.023 \cdot 10^{23} \text{ molècules}}{1 \text{ mol}}$$

essent  $X \text{ ng}/\mu\text{L}$  la concentració de DNA obtinguda de la construcció.

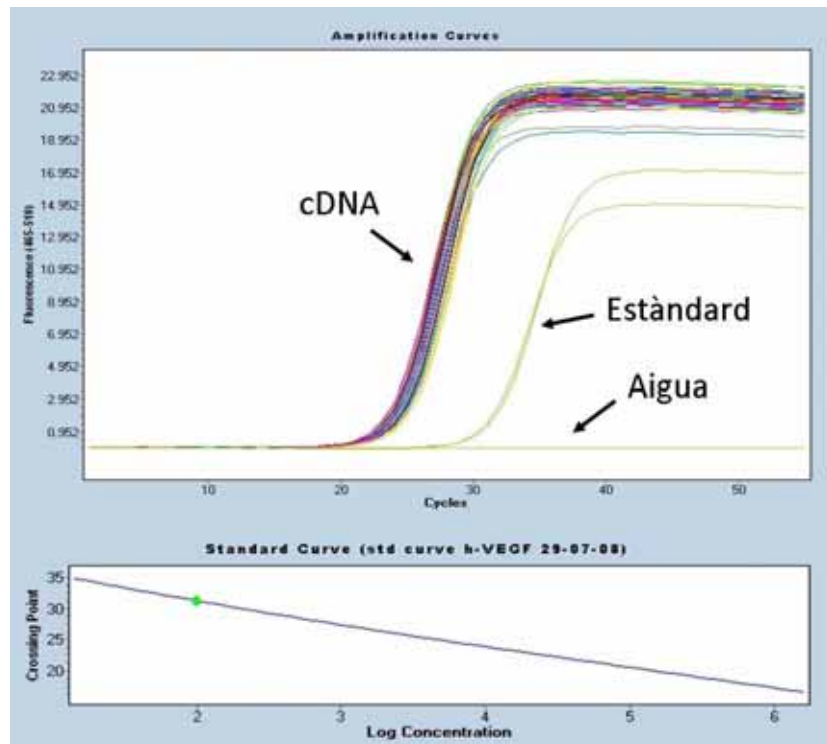
Seguidament, es va preparar un banc de dilucions 1:10 (des de  $10^8$  a 1 molècules de vector) amb cadascun dels vectors amb els seus respectius inserts. Cada dilució es va amplificar per duplicat sota les mateixes condicions i la mitja és la que es va utilitzar per obtenir els punts que formen la recta patró (Figura 11).



**Figura 11. Corbes d'amplificació corresponents a tota la reacció de PCR.** Mostres en dilucions seriades de factor 10 per a la realització d'una corba patró. En l'eix d'abscises es representa el número de cicles i en l'eix d'ordenades la intensitat de fluorescència.

#### 6.7.4. Quantificació de les mostres

Totes les mostres es van analitzar per duplicat i en cada experiment (*run*) de qRT-PCR es va incloure, també per duplicat, un punt de la recta patró; d'aquesta manera es va poder referenciar amb la seva recta patró corresponent en el moment de l'anàlisi (Figura 12). Amb tot, es va determinar la quantitat total de còpies de cDNA d'*HIF-1 $\alpha$* , *VEGF-A*, *TGF- $\alpha$* , *EGFR*, *GAPDH* i  *$\beta$ -2-MICROGLOBULINA* de cada una de les mostres (MMR i xenoempelts). Per això, els valors del número de còpies dels quatre gens obtinguts després de la qRT-PCR van ser normalitzats amb els valors de la quantificació del nostre gen de referència *GAPDH*, d'aquesta manera les mostres es van poder comparar entre sí.



**Figura 12.** Corbes d'amplificació corresponents a un cDNA determinat. La imatge mostra com a exemple l'amplificació de VEGF en mostres de xenoempeles. En la reacció es va incloure un punt de la corba patró com a referència per a poder determinar el número de còpies de les mostres.

## 7. ESTUDIS CITOGENÈTICS

Les alteracions cromosòmiques que es van acumulant al genoma de les cèl·lules tumorals es poden estudiar mitjançant diferents tècniques: la citogenètica convencional, la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) i la hibridació genòmica comparada (CGH). La citogenètica convencional, a banda de la necessitat de tenir cultius, té el gran inconvenient que s'han de cariotipar les metafases; aquesta és una tasca difícil en cèl·lules tumorals degut a la qualitat de les metafases i a la seva clonalitat.

### 7.1. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH) d'EGFR

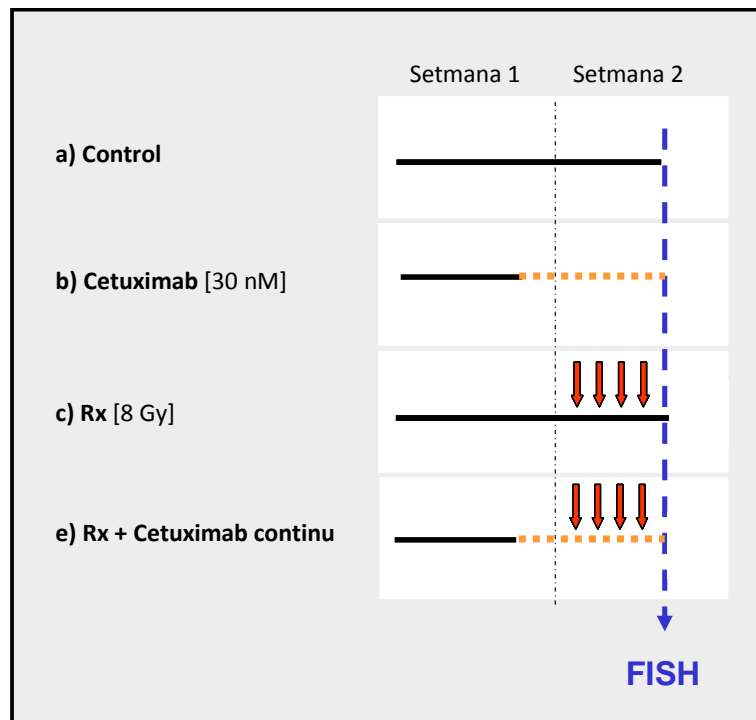
La hibridació *in situ* fluorescent és una tècnica de citogenètica molecular que permet detectar i localitzar la presència o absència de seqüències de DNA específiques, tant en cèl·lules en metafase com en nuclis en interfase. L'aturada del cicle cel·lular en metafase mitjançant la inhibició del fus mitòtic (amb l'ús de colxicina) permet realitzar la hibridació sobre nuclis en metafase. En cas de voler realitzar el FISH en nuclis en interfase, cal prèviament validar les sondes per garantir-ne l'especificitat i la validesa dels resultats. En el nostre cas vam voler comprovar si la sobreexpressió d'EGFR de la línia cel·lular A431 era deguda a una amplificació gènica, i, en cas afirmatiu, si aquesta es veia alterada en tractar les cèl·lules amb radiació, cetuximab o una combinació d'ambdós.

#### 7.1.1. Obtenció de les mostres i preparació de les extensions

Es va dissenyar un esquema de tractament de les cèl·lules similar al de la obtenció de malaltia microscòpica residual. La tècnica de FISH es va realitzar a partir de *pellets* procedents de cultius tractats amb radiació, cetuximab o una combinació d'ambdós, tal com es detalla en la figura 13.

Breument, una vegada finalitzats tractaments, es va afegir a les plaques de cultiu 100 µL de colcemid durant 1 hora per sincronitzar els cultius en l'estadi de metafase. Seguidament, es van realitzar 2 rentats amb PBS 1X i es va afegir la solució hipotònica de clorur de potassi (KCl 0,075 M). Es va deixar incubar durant 10 min a 37 °C. Transcorregut aquest temps es van passar les suspensions cel·lulars a un tub cònic, es van ressuspèndre i es van fixar amb amb metanol:acètic (3:1; v:v) fred i es van guardar 1 hora a 4°C. Després, es centrifugaven els tubs durant 5 min a 20.000 g, s'aspirava el sobrenedant, i es ressuspènia novament el *pellet* amb metanol:acètic. Aquest procés es va repetir 2-3 vegades per a que el *pellet* cel·lular quedés

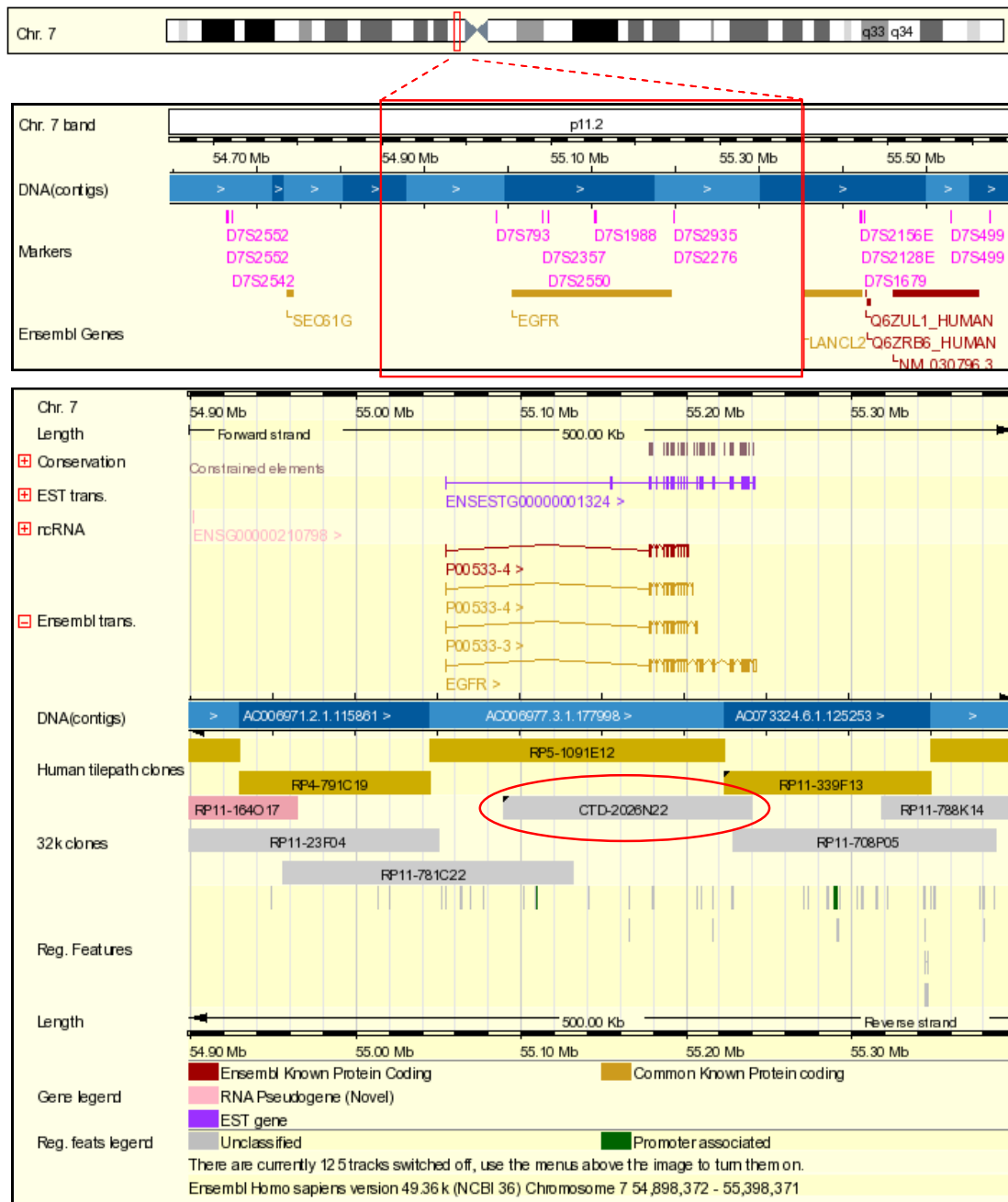
net. Finalment, es repartien 3 gotes en un portaobjectes i es deixava assecar fins que la solució de fixació s'evaporava completament.



**Figura 13. Esquema de tractament de les cèl·lules per a la obtenció de *pellets* cel·lulars per FISH.** Els cultius es van tractar amb cetuximab, radiació o una combinació d'ambdós i es van tripsinitzar en el mateix moment, 24 hores posteriors a la última dosi de radiació.

### 7.1.2. Validació de la sonda

La sonda utilitzada (CTD-2026N22) (Figura 14) va ser cedida pel Dr. Luis Pérez-Jurado. Quan es realitza la tècnica de FISH sobre nuclis en interfase, cal prèviament validar les sondes per garantir la seva especificitat i sensibilitat i, per tant, la validesa dels resultats. Per aquest motiu vam realitzar experiments de FISH sobre metafases i vam verificar que la sonda mapava efectivament a la localització esperada, 7p11.2.



**Figura 14.** Ideograma del cromosoma 7 i localització de la sonda CTD-2026N22 en el gen de l'EGFR a la regió del genoma humà 7p11.2 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). La sonda CTD-2026N22 es va obtenir d'una llibreria artificial de bacteris (BACs) de 32K (CHORI,UK).

### 7.1.3. Marcatge de la sonda

La sonda es va marcar directament amb el fluorocrom *Texas Red-dUTP* mitjançant la tècnica de *Nick Translation* (Vysis) com es detalla en la Taula 9. Es va afegir aigua destil·lada fins a completar un volum final de 50 µL. La reacció va tenir lloc en un bany a 16°C durant 1 hora 45 minuts i es va aturar l'activitat de l'enzim incubant la barreja 10 minuts a 70°C.

### 7.1.5. Gel de comprovació

La mida dels productes del marcatge es va determinar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi. Es va carregar en el gel 5 µL del de cada reacció i es va comprovar, per visualització d'un smear comprès entre 200-1000 pb, que el marcatge havia estat correcte. Fragments massa curts o massa llargs poden donar lloc a soroll de fons i hibridacions granuloses.

**Taula 9. Reactius utilitzats per al marcatge amb *Nick translation*.**

Reactiu	Concentració per reacció	Volum
DNA	900 ng	X µL
<i>Texas Red</i> -dUTPs	2,5 nmol	2,5 µL
dNTPs (C:G:A; 1:1:1)	0,06 mM	10 µL
dTTPs	0,03 mM	5 µL
10x <i>Nick Translation buffer</i>	1x	5 µL
<i>Nick translation enzyme</i>	25U	5 µL

### 7.1.6. Precipitació

Per tal de bloquejar les seqüències repetitives de DNA es va afegir a cada mostra 3 µL de *human Cot-1-DNA* 1 µg/µL i 2 µL de DNA d'esperma de salmó i es va coprecipitar amb 10 µL d'acetat sòdic 10% i 200 µL d'etanol absolut un mínim de 15 minuts a -80°C. La precipitació permet eliminar els dNTPs sobrants de la reacció de marcatge. Transcorregut aquest temps, es van centrifugar els *eppendorfs* 20 min a 20.000 g, es va eliminar el sobrenedant i es van rentar el *pellets* amb 1 mL d'etanol 70%. Seguidament, es van ressuspèndre en 4-6 µL de formamida desionitzada, i després d'incubar-los a 65°C durant 5 min es van afegir 4-6 µL de 12xSSC/20% SDS.

### 7.1.7. Hibridació

Es van pipetejar entre 3 i 5 µL de la sonda sobre portaobjectes amb les extensions, es van cobrir amb un cobreobjectes i es van segellar amb cola. A continuació es van incubar els portaobjectes 3 minuts a 80°C per tal de desnaturalitzar tant la sonda com el DNA i es van hibridar en una cambra humida i fosca a 37°C durant tota la nit.

### 7.1.8. Rentats post-hibridació i muntatge

Després de retirar els cobreobjectes segellats es van rentar els portaobjectes 2 min en la solució 0.4xSSC a 74°C. Seguidament es va fer un segon rentat de 2 min en solució 2xSSC/0.1% Tween 20 a temperatura ambient. Durant els rentats és important agitar els portes contínuament per tal d'eliminar les cadenes de DNA que no hagin hibridat bé. Per últim, es van muntar les preparacions amb DAPI (que tenyeix els nuclis i els cromosomes) i *antifade* (que ajuda a mantenir la fluorescència al llarg del temps). Les preparacions es poden conservar en la foscor a -20°C.

### 7.1.9. Observació i anàlisi de les imatges

La observació i la captura de les metafases hibridades i els nuclis interfàsics es va realitzar mitjançant un microscopi de fluorescència Olympus equipat amb el joc de filtres apropiat. Per a cada hibridació es van comptar les senyals d'un total de 100 nuclis.

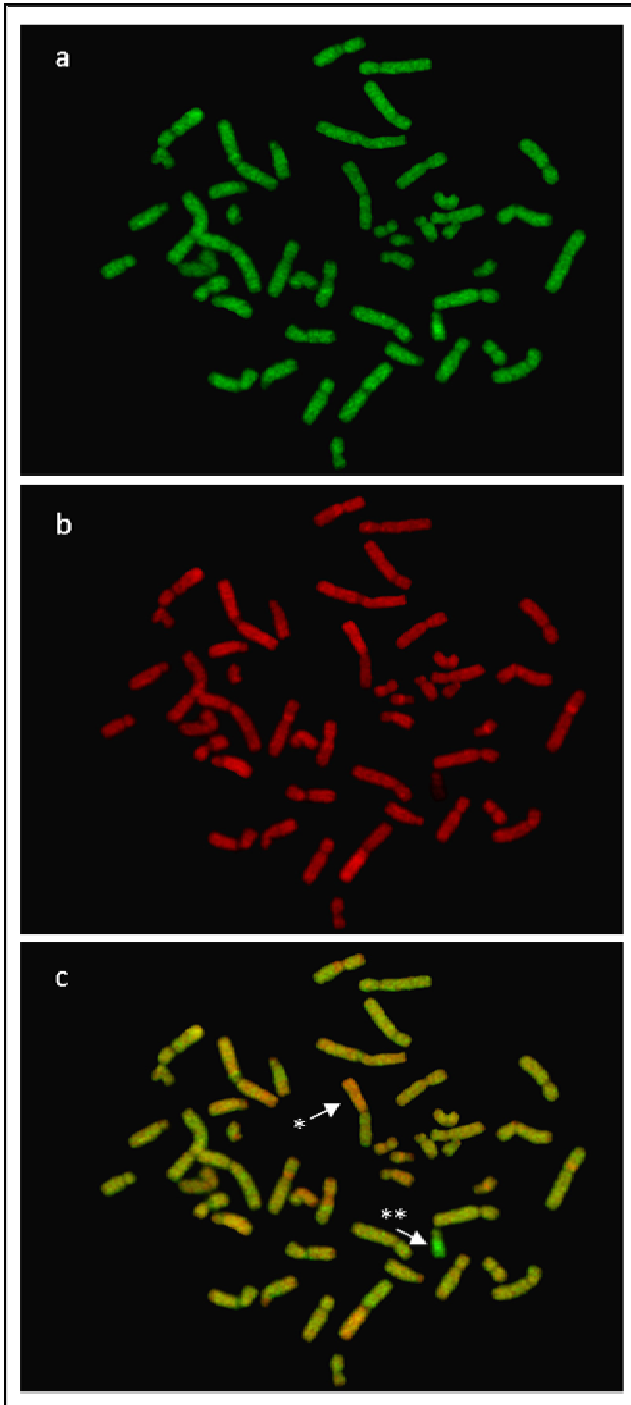
## 7.2. Hibridació genòmica comparada (CGH)

La hibridació genòmica comparada és una tècnica de citogenètica molecular que permet detectar desequilibris en el nombre de còpies de qualsevol cromosoma a partir de DNA genòmic. Es basa en la hibridació competitiva d'un DNA control sense alteracions (referència) amb el DNA de la mostra a estudiar (test) sobre una extensió cromosòmica de limfòcits d'un individu normal. Es marca el DNA de referència amb un fluorocrom verd (o vermell) i el DNA problema amb un de vermell (o verd). Els 2 DNAs es barregen en quantitats equimolars i competeixen per hibridar en les mateixes regions cromosòmiques. Les variacions del número de còpies de les seqüències del DNA tumoral es mesuren mitjançant una anàlisi quantitativa de les imatges digitals obtingudes a través d'un programa informàtic especialitzat, el qual estableix una relació entre la intensitat de fluorescència vermella i verda, calcula la mitjana al llarg de cada cromosoma i li assigna un perfil. D'aquesta manera, a les regions on la quantitat relativa de DNA del test i del control és equivalent, la relació vermell : verd serà 1.0 i la regió es veurà groga. En el cas que la mostra a estudiar tingui un guany d'un cromosoma respecte el DNA control, la relació vermell : verd serà superior a 1.25 i es veurà relativament més vermell. Pel contrari, si hi ha una pèrdua d'un cromosoma en el DNA problema, la relació vermell : verd serà inferior a 0.75 i la regió apareixerà més verda (Figura 15).

Una limitació que presenta aquesta tècnica és que només pot detectar guanys i pèrdues de DNA quan les regions implicades són superiors a 5-10 Mb. A més, no permet detectar reorganitzacions cromosòmiques del tipus inversions i translocacions equilibrades.



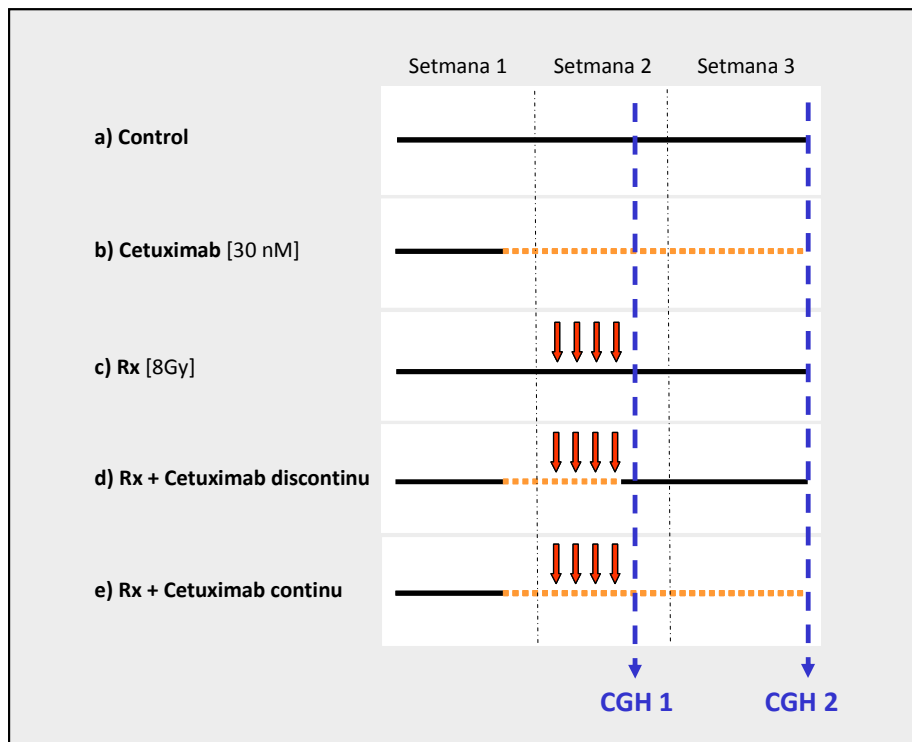
D'altra banda la interpretació de les regions telomèriques és complicada ja que la intensitat de fluorescència d'aquestes disminueix. Les zones pericentromèriques i les grans regions d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9, 16, 19 i 22 no són valorables degut a la gran variabilitat existent en el nombre de còpies dels diferents individus. La CGH implica que per a l'anàlisi s'ha de saber cariotipar.



**Figura 15. Imatges seqüencials d'una hibridació genòmica comparada.** Les imatges corresponen a la hibridació del DNA control 46,XY, en verd (a), al DNA problema, en vermell (b) i a la hibridació competitiva (c). Els dos DNAs competeixen per unir-se a la zona amb la mateixa homologia. El guany de material genètic es mostra amb un predomini de color vermell, com per exemple en 3q (\*), i les pèrdues amb un predomini del color verd, com per exemple el cromosoma Y(\*\*).

### 7.2.1. Obtenció de les mostres

Es va dissenyar un esquema de tractament de les cèl·lules similar al de la obtenció de malaltia microscòpica residual. La tècnica es va realitzar a partir de *pellets* procedents de cultius tractats amb radiació, cetuximab o una combinació d'ambdós, tal com es detalla en la figura 16. A diferència de l'anàlisi de FISH, realitzat 24 hores després de la última dosi de radiació, la CGH també es va realitzar 11 dies després de la última dosi de radiació (coincidint amb la finalització dels cultius de 3 setmanes per obtenir la malaltia microscòpica residual)



**Figura 16. Esquema de tractament de les cèl·lules per a la obtenció de *pellets* cel·lulars per CGH.** Els cultius es van tractar amb cetuximab, radiació o una combinació d'ambdós. Els *pellets* per a la realització de la CGH es van obtenir dels cultius 24 hores (CGH 1) i 11 dies (CGH 2) després de l'última dosi de radiació.

### 7.2.1. Extracció del DNA genòmic

L'extracció del DNA tumoral es va realitzar a partir de *pellets* cel·lulars amb una solució salina a temperatura ambient per evitar la precipitació de sals. També es va obtenir DNA control a partir de limfòcits d'un individu sa 46,XY sense alteracions cromosòmiques.

A cada mostra se li va afegir 1 mL de solució d'extracció (0,05 mM EDTA pH 8, 2 mg/mL proteïnasa K, 0,1% SDS, 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8) i es va deixar a 56°C i en agitació tota la nit. L'endemà, es va centrifugar a 20.000 g durant 5 minuts per separar la fase aquosa (on es

troba el DNA) de la fase orgànica (RNA i proteïnes). Es va recuperar la fase aquosa i es va barrejar per inversió amb clorur sòdic (mostra:NaCl 5M; 1:0,6; v:v). Després de centrifugar a 20.000 g durant 5 minuts es va transferir el sobrenedant a un nou *eppendorf* i es va precipitar el DNA amb 0,6 volums d'isopropanol i 5 µL de glucògen durant 3 hores a -80°C. Transcorregut aquest temps es van centrifugar les mostres a 20.000 g durant 15 minuts i a 4°C per a recuperar els *pellets* de DNA i es va procedir a fer 2 rentats amb etanol 70%. Per últim, es van eixugar els *pellets* i es van ressuspèndre en 20-50 µL d'aigua destil·lada.

#### 7.2.1.2. Quantificació i determinació de la integritat del DNA

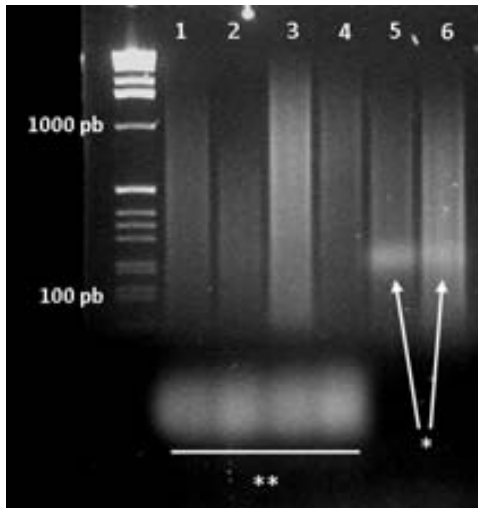
El DNA es va quantificar per mitjà d'espectrofotometria a 260 nm en un espectrofotòmetre NanoDrop i la seva puresa es va determinar a través del quocient de l'absorbància a 260 nm i a 280 nm. En una aproximació de la puresa, es considera que la relació  $A_{260} / A_{280}$  ha de ser superior a 2. La seva integritat es va determinar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% tenyit amb BrEt.

#### **7.2.2. Marcatge**

Es van marcar 900 ng de cada DNA genòmic utilitzant el kit *Nick Translation kit* (Vysis). Mentre l'enzim DNAasa I fa talls en el DNA, la DNA polimerasa I s'hi uneix i va polimeritzant de manera que va desplaçant el tall. Durant la polimerització es van incorporant nucleòtids normals (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i nucleòtids marcats (dUTP) amb una molècula fluorescent conjugada. Aquesta molècula fluorescent pot ser vermella (*Spectrum Red, Texas Red-dUTP*) o verda (*Spectrum Green, FITC*). Els components de la barreja del marcatge van ser els mateixos que en l'estudi per FISH detallats a la Taula 9. Es va afegir aigua destil·lada fins a completar un volum final de 50 µL. La reacció va tenir lloc en un bany a 16°C durant 1 hora 45 minuts i es va aturar l'activitat de l'enzim incubant la barreja 10 minuts a 70°C.

#### **7.2.3. Gel de comprovació**

La mida dels productes del marcatge es va determinar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi. Es va carregar en el gel 5 µL del de cada reacció. Si el marcatge ha sigut l'òptim s'ha de visualitzar un *smear* en cada carril comprès entre 200-1000 pb (Figura 17). Fragments massa curts o massa llargs poden donar lloc a soroll de fons i hibridacions granuloses que es traduiran en fluctuacions en els perfils de CGH. Aquest gel també serveix per a ajustar les equimolaritats de les dues mostres que es volen comparar. Això és fonamental per a obtenir un bon resultat.



**Figura 17. Resultat del marcatge amb Nick Translation de 6 mostres.** Una proporció dels dUTPs marcats no s'incorporen al DNA. Els dUTPs sobrants es visualitzen en diferents regions del gel en funció de si es tracta de dUTPs marcats amb *Spectrum Green* (\*\*) o *Spectrum Red* (\*). La major intensitat de les mostres (carrils 1-6) s'ha de visualitzar entre 100 i 1000 pb.

#### 7.2.4. Precipitació

Per tal de boquejar les seqüències repetitives de DNA es va afegir a cada mostra 3  $\mu$ l de *human Cot-1-DNA* 1  $\mu$ g/ $\mu$ l i 2  $\mu$ l de DNA d'esperma de salmó i es va coprecipitar amb 10  $\mu$ l d'acetat sòdic 10% i 200  $\mu$ l d'etanol absolut un mínim de 15 minuts a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La precipitació permet eliminar els dNTPs sobrants de la reacció de marcatge. Transcorregut aquest temps, es van centrifugar els *ependorfs* 20 min a 20.000 g, es va eliminar el sobrenedant i es va rentar el *pellet* amb 1 mL d'etanol 70%. Seguidament, es va ressuspèndre el botó amb 4-6  $\mu$ L de formamida desionitzada, i després d'incubar-ho a  $65^{\circ}\text{C}$  durant 5 min es van afegir 4-6  $\mu$ L de 12xSSC/20% SDS.

#### 7.2.5. Hibridació

La hibridació dels DNAs es va realitzar sobre extensions cromosòmiques 46,XY de portaobjectes comercials (Vysis). Es va barrejar a sobre del portaobjectes el mateix volum (3  $\mu$ L) del DNA control i del DNA a testar. Es va cobrir amb un cobreobjectes i es va segellar amb cola. A continuació es va incubar el portaobjectes 3 minuts a  $80^{\circ}\text{C}$  per tal de desnaturalitzar tant la sonda com el DNA i es va hibridar en una cambra humida i fosca a  $37^{\circ}\text{C}$  durant 72h. Les hibridacions es van fer per parelles i es van realitzar de la següent manera:

- I. DNA control 46, XY contra DNA de cèl·lules A431 en el punt CGH 1:
  - a) no tractades
  - b) tractades amb cetuximab 30 nM
  - c) tractades amb radiació (8 Gy, 2 Gy cada 24 hores)
  - d) tractades amb radiació i cetuximab discontinu

- e) tractades amb radiació i cetuximab continu

per tal de caracteritzar les alteracions de base.

- II. DNA de les cèl·lules A431 no tractades en el punt CGH 1 contra DNA de cèl·lules tractades en el punt CGH 1 amb:

- b) cetuximab 30 nM  
 c) radiació (8 Gy, 2 Gy cada 24 hores)  
 d) radiació i cetuximab discontinu  
 e) radiació i cetuximab discontinu

per tal de determinar si el tractament tenia algun efecte a nivell genòmic (guanys o pèrdues de material).

- III. DNA de cada tractament en el punt CGH 1 contra el del punt CGH 2:

- control<sub>CGH 1</sub> *versus* control<sub>CGH 2</sub>
- cetuximab<sub>CGH 1</sub> *vs* cetuximab<sub>CGH 2</sub>
- radiació<sub>CGH 1</sub> *vs* radiació<sub>CGH 2</sub>
- [radiació+cetuximab<sub>CGH 1</sub> *vs* radiació+cetuximab<sub>CGH 2</sub>] discontinu
- [radiació+cetuximab<sub>CGH 1</sub> *vs* radiació+cetuximab<sub>CGH 2</sub>] continu

per tal de determinar si el factor temps tenia algun efecte a nivell genòmic.

#### 7.2.6. Rentats post-hibridació i muntatge

Es va treure el cobreobjectes segellat i es van rentar els portaobjectes 2 min en la solució 0.4xSSC calenta a 74°C. Seguidament es va fer un segon rentat de 2 min en solució 2xSSC/0.1% Tween 20 a temperatura ambient. Durant els rentats és important agitar els portes contínuament per tal d'eliminar les cadenes de DNA que no hagin hibridat bé. Per últim, es van muntar les preparacions amb DAPI i *antifade*. Les preparacions es poden conservar en la foscor a -20°C.

#### 7.2.7. Observació i anàlisi de les imatges

La observació i la captura de les metafases hibridades es va realitzar mitjançant un microscopi de fluorescència Olympus connectat a una càmera acoblada a l'ordinador. L'anàlisi es va dur a terme amb el *software Cytovision* (Applied Imaging).

Es van analitzar una mitjana de 10 metafases per cada hibridació. Es van triar les metafases (1) amb cromosomes llargs, separats i amb poques superposicions, (2) amb intensitats altes i equivalents de fluorescència vermella i verda, (3) amb una hibridació uniforme i sense

granulacions i, (4) amb poc soroll de fons. La captura és seqüencial: en primer lloc es captura el senyal corresponent al DAPI, seguidament el verd i per últim el vermell. El *software* estableix una relació entre la intensitat de fluorescència vermella i verda, calcula la mitjana al llarg de cada cromosoma i li assigna un perfil. Finalment, fa la mitjana de totes les cèl·lules analitzades.

## 8. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats es van expressar com a promig  $\pm$  error estàndard (SE). Les comparacions entre els grups de l'assaig clonogènic i la MVD es va realitzar amb les tests no paramètrics Mann-Whitney i t-Student, respectivament, amb un nivell de significació amb dues cues  $p < 0.05$ . El volum tumoral es va comparar amb el test de log-rank. Per l'anàlisi de les dades vam utilitzar el paquet estadístic SPSS (versió 13.0).





**Resultats**



## 1. OBTENCIÓ DE LA SUBPOBLACIÓ CEL·LULAR CORRESPONENT A MALALTIA MICROSCÒPICA RESIDUAL (MMR). AVALUACIÓ *IN VITRO* DE LA SENSIBILITAT A CETUXIMAB

L'eradicació definitiva d'un tumor requereix l'eliminació de totes les cèl·lules tumorals clonogèniques. En oncologia, en general, després dels tractaments estàndard de radioteràpia i quimioteràpia s'assoleix una bona resposta antitumoral. No obstant, fins i tot quan la remissió és completa, l'observació microscòpica del llit tumoral revelaria en molts casos l'existència de focus residuals constituïts per cèl·lules clonogèniques (MMR).

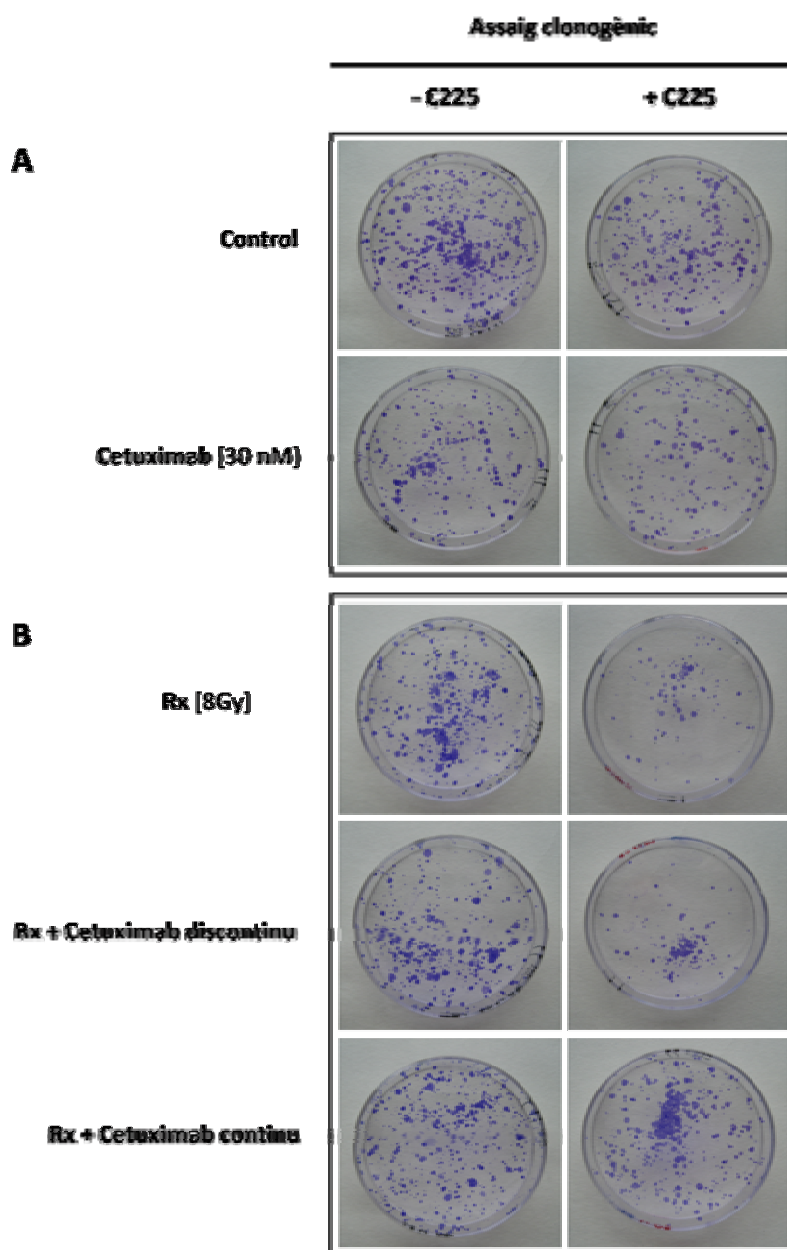
Un dels objectius específics d'aquest estudi va ser el d'avaluar si el manteniment de l'anticòs monoclonal cetuximab després de la radioteràpia podria inhibir les cèl·lules clonogèniques supervivents al tractament inicial, que són les que integren el substrat del concepte de MMR.

Per avaluar aquest primer objectiu vam elaborar un disseny experimental que simulés la MMR en clínica humana; o el que és el mateix, vam determinar *in vitro* la fracció de cèl·lules que després d'un tractament oncològic mantenien la seva capacitat clonogènica i que podrien ser, en última instància, les responsables d'un recreixement tumoral.

Vam sotmetre les cèl·lules A431 a diferents tractaments (Figura 7, pàg 54) amb cetuximab (30 nM), radiació fraccionada (8 Gy) o una combinació d'ambdós agents. Cal dir que les dosis utilitzades d'aquests agents no inactivaven el 100% de les cèl·lules ja que l'objectiu era permetre la supervivència d'una fracció de cèl·lules després dels tractaments. La fracció de cèl·lules supervivents es va determinar mitjançant assaig clonogènic. Addicionalment, també es va avaluar l'efecte de cetuximab (30 nM) durant la formació de colònies.

En tots els casos les colònies (> 50 cèl·lules,  $\approx$  6 mitosis acumulades) van ser fàcilment visibles transcorreguts 14 dies, moment en què es va procedir a la tinció amb cristall violeta pel comptatge de les colònies formades (Figura 18).

En experiments pilot vam excloure dosis de radiació superiors a 8 Gy (12, 15 i 20 Gy) i de cetuximab (60 i 120 nM) ja que l'excessiva mortalitat cel·lular impedia continuar amb l'assaig.



**Figura 18. Assaig de formació de colònies.** Es van sembrar per triplicat 1000 (A) o 5000 (B) cèl·lules en plaques de 6 cm de diàmetre. Les cèl·lules s'havien tractat previament com s'indica a l'esquerra de les plaques. Després, durant la formació colònies, les cèl·lules es van incubar en absència o presència de cetuximab 30 nM. Transcorreguts 14 dies les colònies es van tenyir amb cristall violeta. La presència de l'anticòs durant l'assaig clonogènic va provocar una disminució en el número de colònies excepte en els casos en què cetuximab va estar present de manera continuada durant el tractament previ.

### 1.1. Determinació de l'eficiència de clonació (CE) i fracció supervivent (SF)

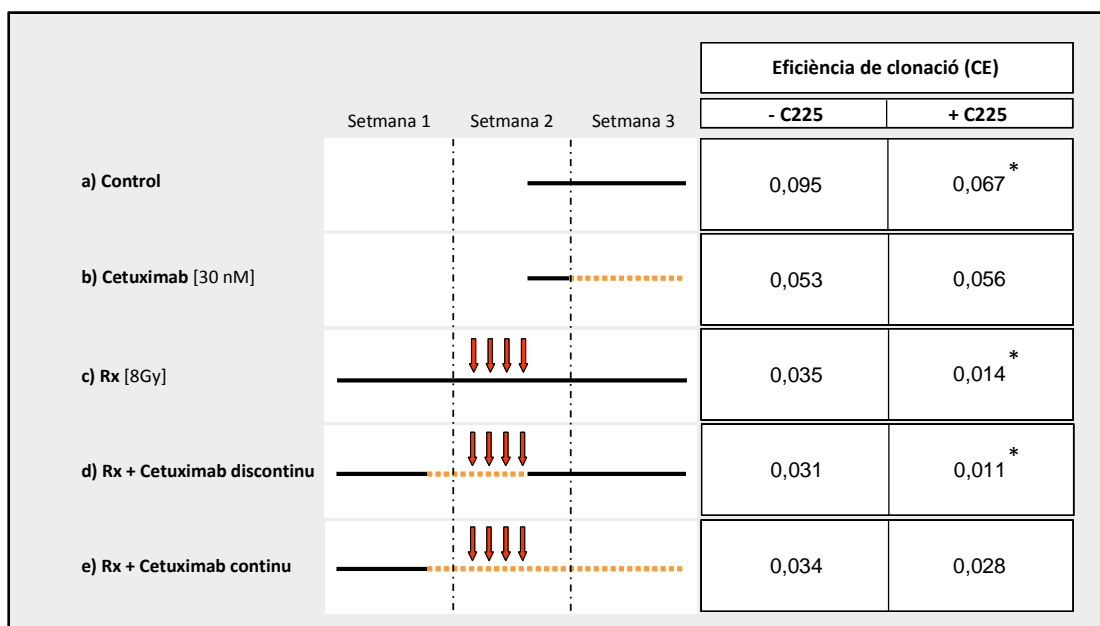
L'eficiència de clonació basal (colònies comptades/cèl·lules sembrades) de les cèl·lules A431 en el nostre laboratori va ser de 0,095 (9,5%) (Figura 19A). Quan les vam tractar amb cetuximab 30 nM durant 7 dies la CE va disminuir a un 0,056 (5,6%) (Figura 19A), que en termes de fracció supervivent SF (CE tractament/ CE basal) correspon a un 59% (0,056/0,095 x

100). Aquesta disminució de la capacitat clonogènica indica que cetuximab a les dosis utilitzades inhibeix el creixement de les A431.

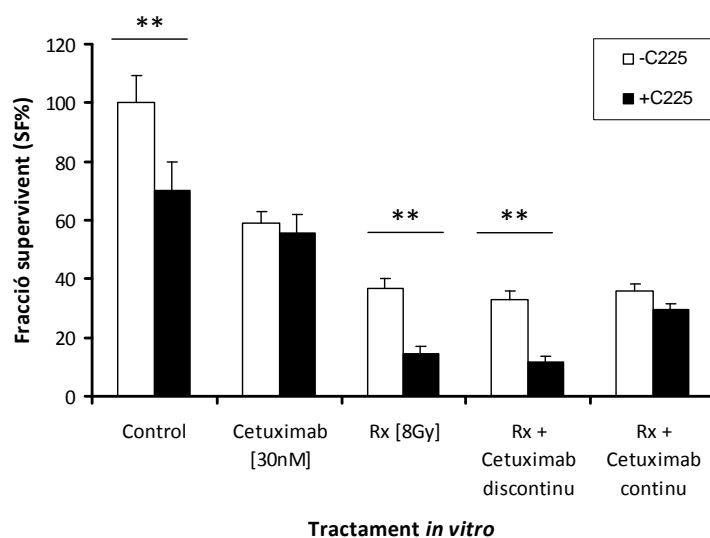
Per tal d'examinar l'efecte de la radiació ionitzant, les A431 es van irradiar en monocapa durant 4 dies fins a 8 Gy (2 Gy cada 24 hores) i es van mantenir en les mateixes plaques de cultiu durant 2 setmanes. Cal remarcar que es va deixar el període de 2 setmanes per a permetre la reparació del dany radioinduït i la repoblació de la monocapa cel·lular a partir de les cèl·lules resistents, mentre que les cèl·lules que no van sobreviure a la radiació es van eliminar durant els canvis de medi. En aquestes circumstàncies, les cèl·lules van mostrar canvis morfològics progressius compatibles amb el dany produït per la radiació (nuclis més grans, citoplasma vacuolitzat i fusió de citoplasmes) (Figura 20). La formació de colònies després d'aquest procés va tenir una eficiència de clonació del 0,035 (SF = 37%) (Figura 19A), indicatiu que aproximadament un terç del cultiu era resistent a la radiació administrada.

El tractament amb cetuximab concomitant a la radioteràpia està indicat en determinats tipus de càncer, per aquest motiu vam analitzar l'efecte dels 2 agents combinats. Quan es va administrar cetuximab 30 nM durant la irradiació no es va observar cap disminució en la formació de colònies comparat amb la irradiació sola, CE 0,031 i 0,034, respectivament (Figura 19A). El mateix es pot dir si considerem la SF 33% i 36%, respectivament (Figura 19B). L'absència d'efecte en afegir cetuximab suggereix, més que una manca d'activitat de l'anticòs, que els cultius es van repoblar per cèl·lules resistents al tractament combinat sense una acumulació de dany addicional que afectés a la CE.

**A**



**B**



**Figura 19. Eficiència de clonació (CE) i fracció de cèl·lules supervivents (SF) de les cèl·lules A431 sotmeses a diferents tractaments *in vitro*.** Després de tractar els cultius amb cetuximab, radiació o una combinació d'ambdós es van tripsinitzar les cèl·lules i es va realitzar un assaig clonogènic en presència (■) i absència (□) de C225. (A) Els valors de CE provenen del quocient entre el número de colònies comptades i el de cèl·lules sembrades. (B) Percentatge de cèl·lules que sobreviuen als tractaments; els valors provenen del quocient entre la CE de les cèl·lules tractades i la CE de les cèl·lules basals. Tant la CE com la SF disminueixen en afegir cetuximab durant el període de formació de colònies. Les dades provenen de 9 experiments independents, cada un elaborat per triplicat. \* $P < 0.05$  comparat amb l'assaig clonogènic en absència de cetuximab. \*\* $P < 0.05$  comparat amb la fracció supervivent en absència de cetuximab (Test de Mann-Whitney).

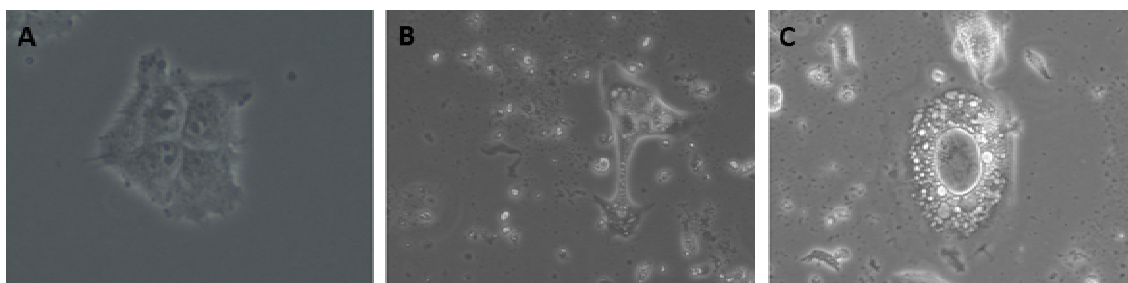
## 1.2. Efectes de cetuximab sobre la malaltia microscòpica residual

Una vegada establerta la proporció de cèl·lules amb capacitat clonogènica (MMR) segons els diferents esquemes de tractament, vam voler avaluar la sensibilitat de la MMR front a l'anticòs cetuximab. Per això, les cèl·lules A431 es van tractar amb cetuximab 30 nM durant el període de formació de colònies. L'addició de cetuximab 30 nM va disminuir significativament la CE basal de 0,095 a 0,067 (SF = 70%), indicant de nou l'existència d'una resposta inhibidora (Figura 19). En canvi, quan es va avaluar la CE en les cèl·lules pretractades amb cetuximab sol no es van observar canvis en el nombre de colònies (Figura 19).

En el cas de les cèl·lules irradiades, es va produir un descens en la CE de 0,034 fins a 0,014 (SF = 14,7%) (Figura 19), fet que suggereix una vegada més un efecte inhibidor de cetuximab i mostra una clara activitat contra la MMR després de la irradiació.

De la mateixa manera, la MMR procedent del tractament amb radiació i cetuximab discontinu (esquema d) va ser sensible a l'aplicació addicional de cetuximab durant l'assaig clonogènic (CE = 0,011) (SF = 11,6%) (Figura 19). Per contra, quan cetuximab es va continuar administrant després de la irradiació la MMR resultant va ser insensible al cetuximab administrat durant la formació de colònies (CE= 0,034 vs 0,028) (Figura 19).

En conjunt, aquestes dades indiquen una sensibilitat inicial a cetuximab seguida per una desensibilització enfront a l'exposició continuada, i suggereixen l'existència d'una selecció i repoblació dels cultius per cèl·lules resistents al tractament. És interessant notar que l'adaptació en aquestes condicions va ser transitòria tal com ho demostra la re-sensibilització a cetuximab en l'esquema d.



**Figura 20. Imatges corresponents a cèl·lules A431 en cultiu.** Imatges obtingudes a 40x. (A) Agrupació de 4 cèl·lules A431 sense irradiar. (B) Fusió i (C) vacuolització de citoplasmes provocat per la radiació ionitzant.

## 2. AVALUACIÓ *IN VIVO* DE LA SENSIBILITAT A CETUXIMAB I CARACTERITZACIÓ MICROSCÒPICA DELS XENOEMPELTS

Per tal que el disseny experimental simulés millor un escenari clínic d'adjuvència vam assumir que del total de cèl·lules injectades per generar els tumors, únicament la fracció clonogènica (MMR) seria la pròpiament tumorigènica, i per tant la rellevant per estimar l'impacte del manteniment de cetuximab sobre una possible reducció de recidives.

Consistent amb aquest concepte, i per tal de comparar l'acció *in vivo* de cetuximab sobre la MMR, vam injectar el mateix nombre de cèl·lules clonogèniques en cada tipus d'esquema de tractament utilitzat (Figura 7, pàg 54), ajustant el nombre total de cèl·lules en funció de les CE obtingudes.

Experimentalment vam observar que la injecció de  $1 \times 10^6$  de cèl·lules A431 no tractades originava tumors amb una eficiència pròxima al 100% i amb una latència convenient. A partir de l'eficiència de clonació basal (0,095) vam poder estimar la presència de 95.000 cèl·lules clonogèniques en aquest milió de cèl·lules, fet que vam aplicar a la totalitat de l'estudi tal com s'indica a la Taula 10.

**Taula 10. Número total de cèl·lules injectades per tumor**

Tractament <i>in vitro</i>	CE	cèl·lules injectades	Cèl·lules clonogèniques
Control	0,095	$1 \times 10^6$	95.000
Cetuximab [30 nM]	0,053	$1,7 \times 10^6$	95.000
Rx [8 Gy]	0,035	$2,7 \times 10^6$	95.000
Rx + cetuximab discontinu	0,031	$3 \times 10^6$	95.000
Rx + cetuximab continu	0,034	$2,7 \times 10^6$	95.000

A partir de l'eficiència de clonació es va calcular el nombre de cèl·lules totals a injectar a ratolins atímics. Es va injectar el mateix nombre de cèl·lules clonogèniques en tots els tractaments.

Es van realitzar un total de 9 experiments independents, 6 on el punt final venia donat quan els tumors assolien una mida de  $1000 \text{ mm}^3$  i 3 experiments on els tumors adquirien un volum de  $100 \text{ mm}^3$ . En cada un d'ells, es van injectar a dia 0 les cèl·lules provinents de cada tipus de tractament *in vitro* a 6 ratolins atímics, 3 dels quals van rebre sèrum fisiològic i 3 van



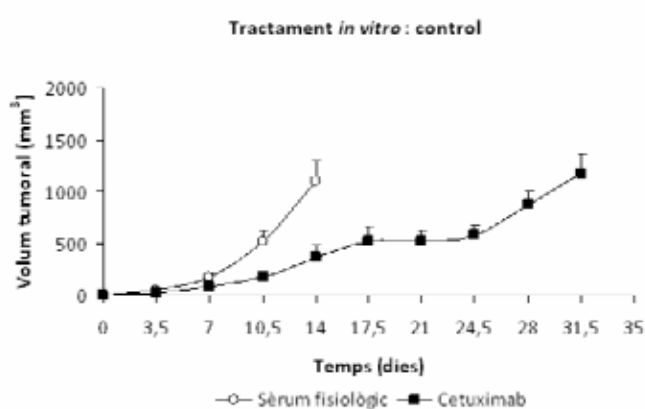
ser tractats amb cetuximab 0,05 mg dues vegades a la setmana. De forma similar a la clínica, es va administrar una dosi de cetuximab extra 3,5 dies previs a la injecció de les cèl·lules.

Cal destacar que, a diferència del nostre estudi, en els treballs publicats fins ara sempre s'ha administrat cetuximab enfront de tumors ja desenvolupats. En el nostre cas es va començar el tractament en el moment de la injecció de cèl·lules tumorals ja que l'objectiu era avaluar el paper adjuvant del fàrmac sobre les cèl·lules clonogèniques resistents al tractament inicial, en una situació que simularia el risc de MMR en un malalt.

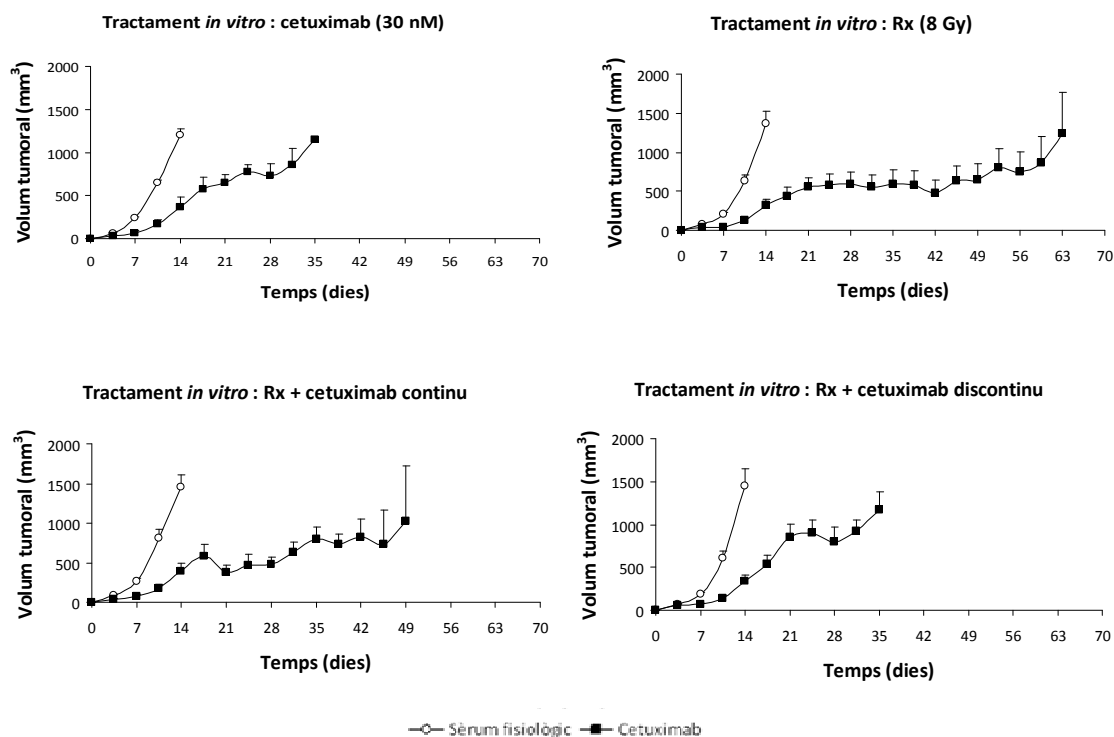
### 2.1. Avaluació de l'activitat antitumoral de cetuximab

Després de la injecció de les cèl·lules (Taula 10) es van mesurar els xenoempelts cada 3,5 dies per tal de realitzar un seguiment de la cinètica de creixement tumoral.

En contrast amb les troballes *in vitro*, el manteniment de cetuximab *in vivo* va tenir un impacte negatiu sobre el creixement dels tumors generats a partir de cèl·lules A431 no tractades prèviament. L'anticòs no només va retardar el dia en què es palpava i apareixia el tumor sinó que també va provocar un alentiment en el creixement d'aquest (Figura 21). Un resultat interessant va ser l'observació de la inhibició del creixement tumoral en tumors derivats de cèl·lules prèviament tractades amb cetuximab i/o radiació, fins i tot en condicions en les que *in vitro* s'havia observat una aparent desensibilització a cetuximab. (Figura 22).



**Figura 21. Efecte de cetuximab sobre el creixement dels xenoempelts de cèl·lules A431 no tractades prèviament *in vitro*.** Es van injectar 95.000 cèl·lules clonogèniques a ratolins atímics. Es van tractar els animals amb 0,05 mg de cetuximab cada 3,5 dies o sèrum fisiològic. Cetuximab va alentir el creixement dels xenoempelts originats a partir de cèl·lules A431. Els valors provenen del promig de 6 experiments independents amb 3 ratolins cadascun  $\pm$  SE.



**Figura 22.** Efecte de cetuximab sobre el creixement dels xenografts derivats de cèl·lules A431 pretractades *in vitro* amb cetuximab, radiació o una combinació dels dos. Es van injectar 95.000 cèl·lules clonogèniques de cada tractament *in vitro* a ratolins atòmics. Es van tractar els animals amb 0,05 mg de cetuximab (■) cada 3,5 dies o sèrum fisiològic (□). Els valors provenen del promig de 6 experiments independents amb 3 ratolins cadascun  $\pm$  SE.

De forma intrigant, els tumors derivats de cèl·lules irradiades van créixer significativament més ràpid que els procedents de cèl·lules A431 no irradiades, suggerint la possibilitat de que la radioteràpia hagués induït un creixement tumoral accelerat. Així, per exemple, el temps necessari per a que un tumor arribés a 100 mm<sup>3</sup> va ser de 7,9 dies en els ratolins tractats amb sèrum fisiològic injectats amb cèl·lules no tractades, mentre que si havien estat irradiades aquest temps va ser significativament inferior (4,8 dies) (Taula 11). Es van obtenir resultats similars en tumors derivats de cèl·lules tractades amb cetuximab *in vitro*, tant per sí sol com combinat amb la radiació, especialment quan l'anticòs es va mantenir fins el moment de la injecció.

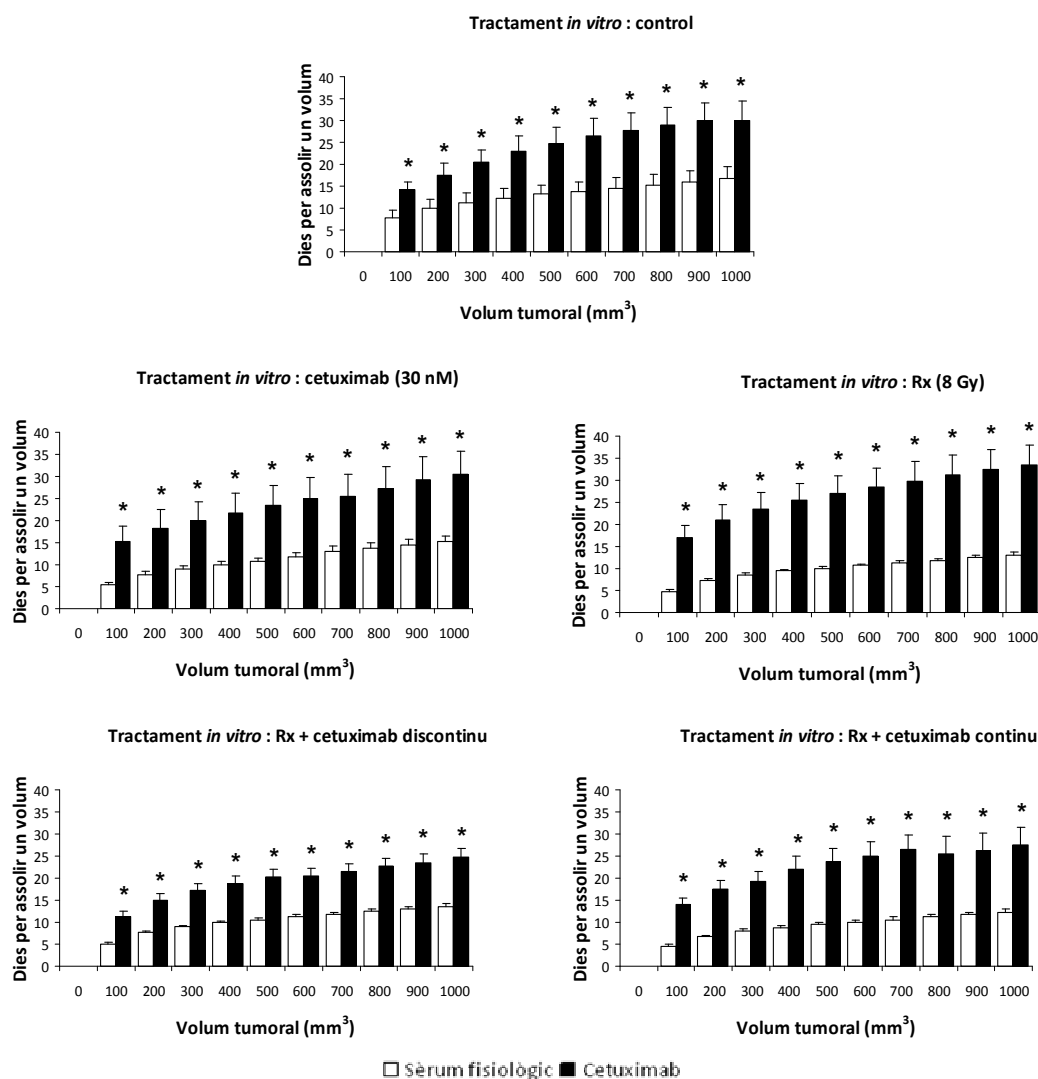
En tots els casos, cetuximab administrat *in vivo* va retardar el creixement dels xenoempelts assolint una ratio d'entre 1,81 i 3,52, segons el tractament administrat.

**Taula 11. Dies necessaris per arribar a 100 mm<sup>3</sup> de volum tumoral en funció del tractament.**

Tractament <i>in vitro</i>	Tractament <i>in vivo</i>			
	Sèrum fisiològic	Cetuximab	P-valor	Ratio
Control	7,9 ± 1,6	14,3 ± 1,7	0.001	1,81
Cetuximab [30 nM]	5,6 ± 0,4	15,2 ± 3,6	< 0.001	2,71
Rx [8 Gy]	4,8 ± 0,35*	16,9 ± 2,8	< 0.001	3,52
Rx + cetuximab discontinu	5,0 ± 0,3*	11,3 ± 1,1	< 0.001	2,26
Rx + cetuximab continu	4,6 ± 0,4*	13,9 ± 1,6	< 0.001	3,02

Els dies per arribar a 100 mm<sup>3</sup> es mostren com el promig ± SE de 6 experiments independents amb 3 ratolins cadascun. \**P* < 0.05 versus els tumors derivats de cèl·lules no tractades (Test de Mann-Whitney i test de Log-rank).

Les diferències observades en el creixement inicial es van mantenir al llarg de tot el creixement tumoral fins el moment del sacrifici dels animals, que venia donat quan els tumors assolien un volum de 1000 mm<sup>3</sup> (figura 23).

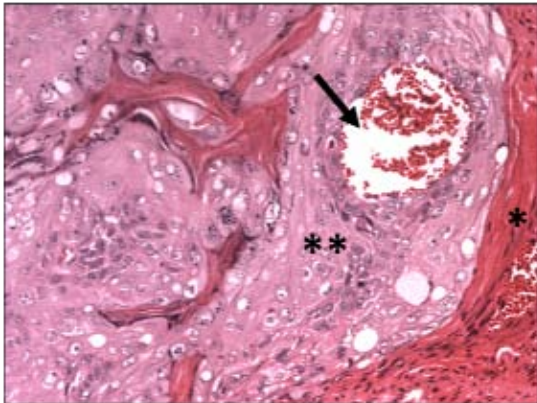


**Figura 23. Temps que triguen els xenoemoepelts en arribar a un volum determinat en funció del tractament.** Els ratolins atímics es van randomitzar per a rebre sèrum fisiològic o cetuximab 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. Els tumors de ratolins tractats amb cetuximab van necessitar més temps per arribar al mateix volum que els dels ratolins que rebien sèrum fisiològic. Els valors provenen del promig de 6 experiments independents amb 3 ratolins cadascun  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  comparat amb el tractament amb sèrum fisiològic (Test de Log-rank).

## 2.2. Caracterització microscòpica dels xenoempelts

Per avaluar si el creixement accelerat estava associat a canvis relacionats amb la biologia tumoral, es van caracteritzar a nivell morfològic els tumors generats a partir de la injecció de MMR procedent de cèl·lules tractades amb irradiació exclusiva. Per avaluar l'efecte del tractament *in vivo* es va determinar l'angiogènesi associada al tumor, l'índex de proliferació cel·lular, l'apoptosi tumoral i la infiltració dels tumors per macròfags. Es van fer les determinacions en tumors de 100 mm<sup>3</sup>, excepte per l'angiogènesi que es van fer en tumors de 100 i de 1000 mm<sup>3</sup>.

Des d'un punt de vista histològic, l'examen amb hematoxilina i eosina va mostrar que els xenoempelts es caracteritzaven per ser tumors ben diferenciats, amb un elevat percentatge de fibres de queratina, patró característic dels carcinomes escamosos humans (Figura 24).



**Figura 24. Tinció amb hematoxilina i eosina d'un xenoempelt originat a partir de cèl·lules A431.** Imatge obtinguda a 20x. La tinció es va realitzar sobre un tall de parafina. La seta assenyalava la llum d'un vas sanguini, amb hematies al seu interior. La regió rosa fosc (\*) correspon a les fibres de queratina i la lila (\*\*) a la regió tumoral.

### 2.2.1. Avaluació de l'angiogènesi associada a tumor

L'efecte antitumoral de cetuximab va contrastar amb la desensibilització desenvolupada *in vitro*, indicant que la resposta *in vivo* recau en part sobre mecanismes com la interacció de les cèl·lules tumorals amb l'estroma, fet que no és necessari pel creixement tumoral *in vitro*. Els tumors depenen de les cèl·lules estromals pel seu suport fisiològic, incloent la participació de la vasculatura associada al tumor. Per tal d'atraure i reclutar cèl·lules estromals, les cèl·lules tumorals emeten senyals mitogèniques i tròfiques involucrades en cascades que promouen la supervivència i invasió cel·lular. En el nostre model animal, s'espera que les cèl·lules tumorals interaccionin amb les estromals per tal de suportar el seu propi creixement.

Per caracteritzar els xenoempelts des d'un punt de vista angiogènic, tant en funció de la procedència cel·lular (MMR) com de la resposta al tractament, vam realitzar un marcatge immunohistoquímic per a la detecció de CD31/PECAM. Es van analitzar un total de 6 experiments independents amb 3 tumors per cada grup de tractament amb un volum de 1000 mm<sup>3</sup>. En general, els vasos sanguinis eren arrodonits, amb una àmplia llum i una distribució homogènia. L'anàlisi immunohistoquímic no va revelar diferències significatives en la distribució vascular, en l'aspecte dels vasos o en la densitat vascular (MVD) en funció del tractament (Taula 12).

**Taula 12. Densitat vascular en xenografts de 1000 mm<sup>3</sup> en funció del tractament**

Tractament <i>in vitro</i>	Tractament <i>in vivo</i>			
	Sèrum fisiològic	Cetuximab	P-valor	Ratio
Control	7,27 ± 0,45	6,73 ± 0,37	NS	1,08
Cetuximab [30 nM]	7,35 ± 0,36	6,06 ± 0,30	0.008	1,21
Rx [8 Gy]	7,31 ± 0,32	8,28 ± 0,51	NS	0,88
Rx + cetuximab discontinu	8,64 ± 0,38	8,82 ± 0,43	NS	0,98
Rx + cetuximab continu	8,21 ± 0,43	7,15 ± 0,41	NS	1,15

Cada tumor es va examinar a baix augment (x100) i es van comptar els vasos sanguinis de 5 camps a x400 augments. Els valors es mostren com el promig del número de vasos ± SE de 6 experiments independents amb 3 tumors per cada branca de tractament (Test de t-Student).

Vam considerar que les diferències en la densitat vascular es podrien observar amb més facilitat a l'inici del creixement tumoral que en fases més avançades o consolidades. Assumint aquesta possibilitat es van obtenir tumors entre 100 i 200 mm<sup>3</sup> (promig de 175,97 ± 6,91 mm<sup>3</sup>) provinents de 3 experiments independents amb 3 tumors per esquema de tractament. La determinació de CD31/PECAM en aquests tumors va mostrar, a priori, una major densitat de vasos sanguinis i de menor mida que els observats en els xenoempelts més grans (1000 mm<sup>3</sup>).

Més notable va ser l'observació de que els tumors derivats de cèl·lules irradiades van presentar un valor de MVD major que els tumors derivats de cèl·lules control (o no tractades) (35,63±1,7 vs 18,49±1,47) (Taula 13, Figura 25). El tractament *in vitro* amb cetuximab sol no va modificar significativament la MVD. Per contra, l'addició de cetuximab a la radiació durant tot el temps de la generació de la MMR va frenar la força de l'angiogènesi. En aquest esquema es va passar de 35,63 a 27 de MVD ( p < 0.001). És interessant ressaltar que quan el cetuximab es va retirar després de la radioteràpia, les cèl·lules irradiades van generar tumors tant altament vascularitzats com si s'hagués administrat radioteràpia exclusivament. No obstant això, en aquest cas la sensibilitat a l'anticòs va reaparèixer quan els animals van ser tractats amb cetuximab (Taula 13). Crida l'atenció la saturació de l'efecte anti-angiogènec en els tumors derivats de cèl·lules que es van mantenir contínuament exposades a l'anticòs, fet que suggereix la possibilitat d'un fenomen adaptatiu similar a l'observat en la formació de colònies.

Taula 13. Densitat vascular en xenoempelts de 100 mm<sup>3</sup> en funció del tractament.

Tractament <i>in vitro</i>	Tractament <i>in vivo</i>			
	Sèrum fisiològic	Cetuximab	P-valor	Ratio
Control	18,49 ± 1,47	14,80 ± 0,93	0.038	1.25
Cetuximab [30 nM]	22,20 ± 1,23	18,93 ± 0,98	0.041	1.17
Rx [8 Gy]	35,63 ± 1,70 *	23,96 ± 1,41	< 0.001	1.49
Rx + cetuximab discontinu	34,29 ± 1,32 *	24,98 ± 1,60	< 0.001	1.37
Rx + cetuximab continu	27,00 ± 1,68 *; **	24,53 ± 1,25	NS	1.10

Cada tumor es va examinar a baix augment (x100) i es van comptar els vasos sanguinis de 5 camps a x400 augments. Els valors es mostren com el promig del número de vasos ± SE de 3 experiments independents amb 3 tumors per cada branca de tractament (Test de t-Student). \*  $P < 0.05$  versus control; \*\*  $P < 0.05$  versus Rx o Rx+cetuximab discontinu.

En conjunt, la potència de l'angiogènesi va ser major en els xenoempelts derivats de cèl·lules irradiades, en els que cetuximab administrat *in vivo* va ser altament efectiu (ratio 1,49 per cèl·lules irradiades exclusivament) (Figura 25). L'exposició mantinguda a cetuximab va disminuir l'angiogènesi. Aquestes dades indiquen que cetuximab inhibeix l'angiogènesi mediada per les cèl·lules tumorals i que aquesta inhibició depèn del bloqueig de l'EGFR.

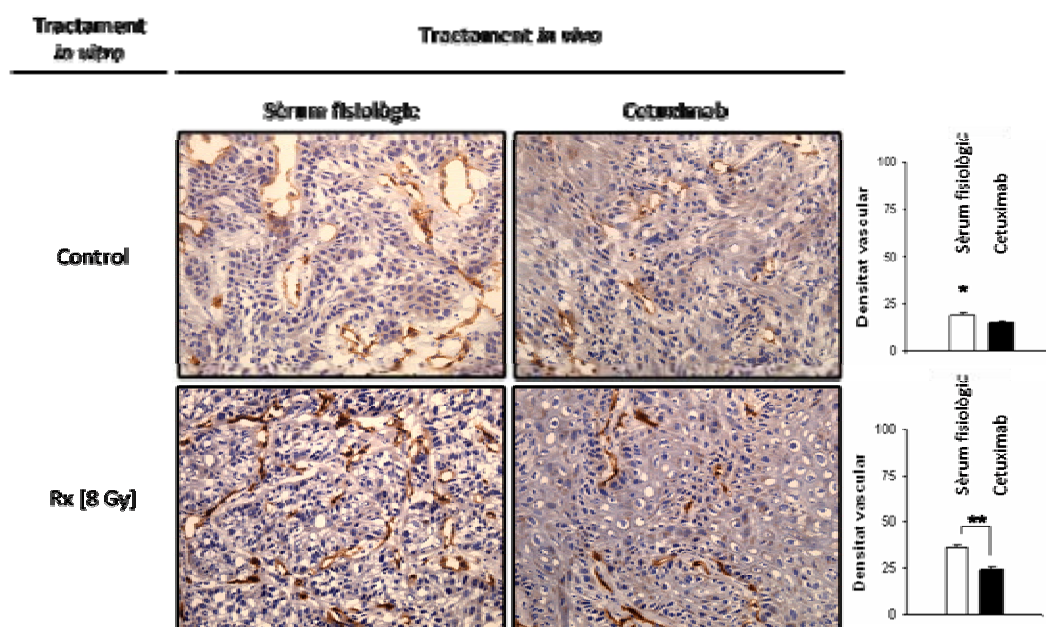
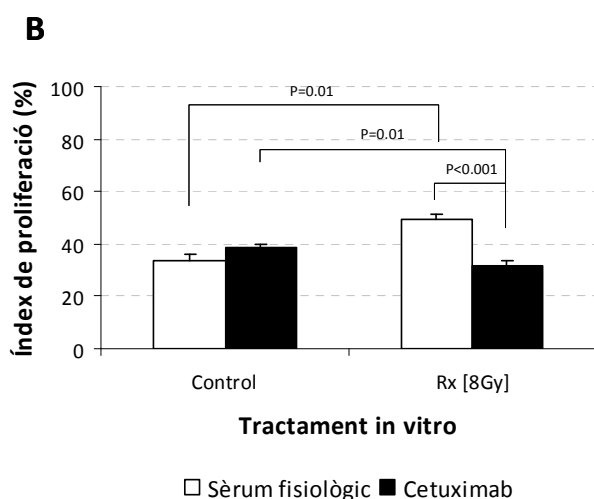
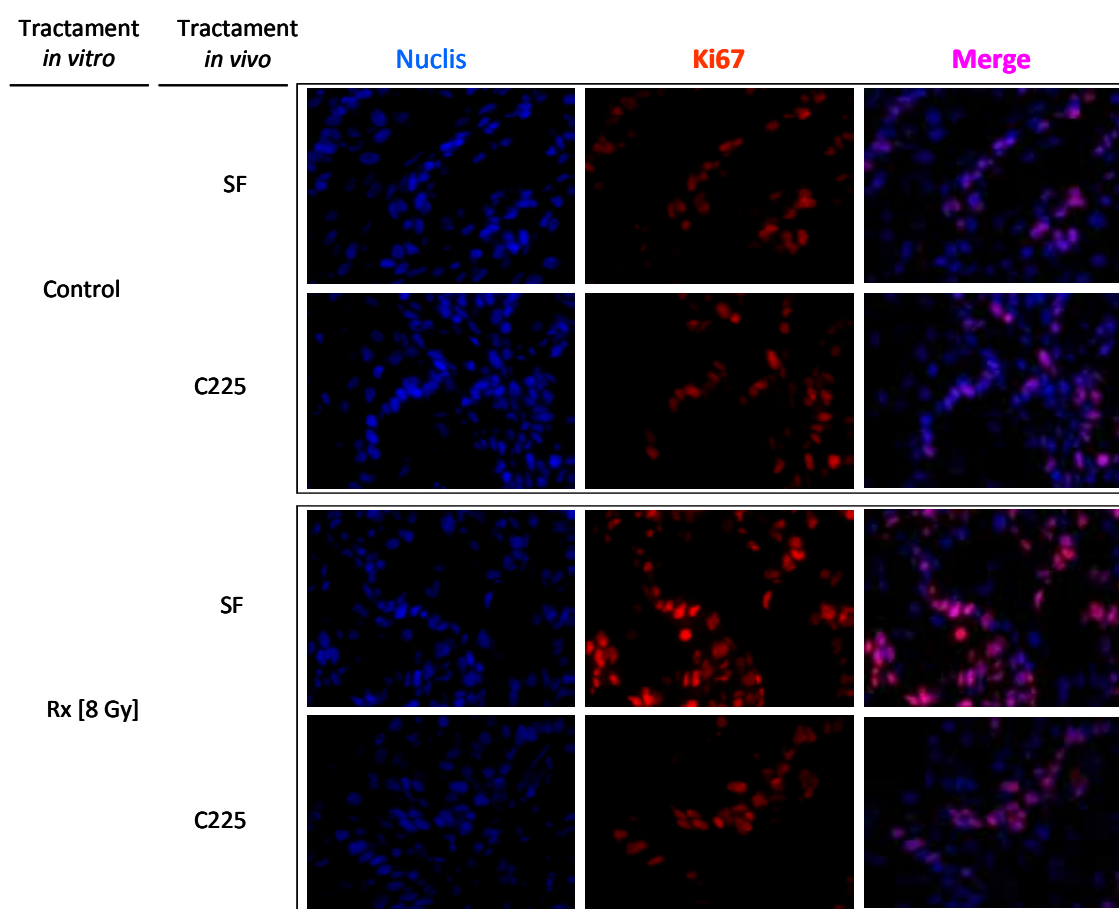


Figura 25. Immunohistoquímica de CD31 sobre seccions d'OCT i densitat vascular de tumors de 100 mm<sup>3</sup> derivats de cèl·lules irradiades i no irradiades. Imatges obtingudes a 20x. Els ratolins es van tractar amb sèrum fisiològic o cetuximab 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. Cetuximab va inhibir preferencialment l'angiogènesi de tumors procedents de cèl·lules irradiades. Els valors s'expressen com el promig ± SE de 3 experiments independents amb 3 ratolins cadascun (Test de t-Student). \* $P < 0.05$  comparat amb tumors de cèl·lules irradiades en ratolins que reben sèrum fisiològic. \*\* $P < 0.0001$  comparat amb el tractament *in vivo* de cetuximab.

### 2.2.2. Avaluació de la proliferació i apoptosi cel·lular

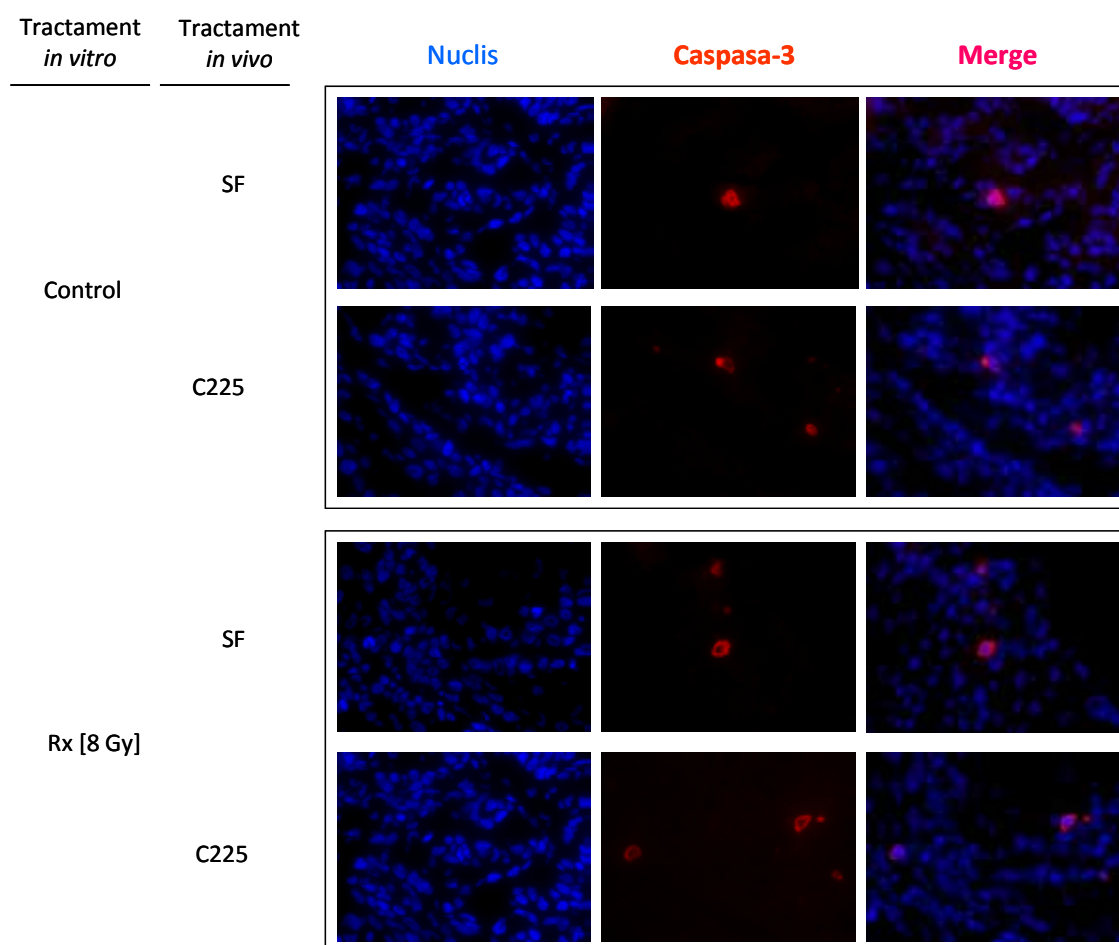
Per tal de verificar si les variacions en el creixement tumoral estaven relacionades amb diferències en la fracció cel·lular en proliferació, es va determinar l'índex de proliferació en aquests tumors a través del marcatge immunofluorescent de l'antigen Ki67 (Figura 26A). Els tumors generats a partir de cèl·lules no tractades van mostrar un índex de proliferació de  $33,74 \pm 2,33\%$ , significativament inferior al  $49,34 \pm 1,81\%$  dels tumors originats a partir de cèl·lules irradiades (Figura 26B, Taula 12). L'elevat índex de Ki67 en aquests últims és consistent amb el creixement accelerat dels tumors derivats de cèl·lules irradiades. Quan els ratolins van ser tractats amb cetuximab, es va confirmar l'intens efecte de l'anticòs sobre els xenoempelts procedents de tumors irradiats ja que l'índex de proliferació va disminuir de  $49,34 \pm 1,81\%$  fins a  $31,4 \pm 2,23\%$ . Per contra, aquesta reducció no es va observar en tumors derivats de cèl·lules no irradiades ( $33,74 \pm 2,33\%$  a  $38,5 \pm 1,58\%$ ) (Figura 26B, Taula 12). La intensa resposta a cetuximab observada en els xenoempelts obtinguts de cèl·lules irradiades suggereix que aquests tumors són altament depenents (addictes) d'EGFR.



**A**

**Figura 26. Estudi de la proliferació cel·lular de tumors de 100 mm<sup>3</sup> derivats de cèl·lules irradiades i no irradiades. (A)** Imatges obtingudes a 20x corresponents a immunofluorescències sobre seccions d'OCT de Ki67 (vermell) i d'un marcador nuclear (blau). Els ratolins es van tractar amb sèrum fisiològic (□) o cetuximab (■) 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. **(B)** Quantificació de la proliferació tumoral. Es mostra el % de cèl·lules Ki67 positives respecte el total de cèl·lules tumorals. Cetuximab inhibeix preferencialment la proliferació de tumors procedents de cèl·lules irradiades. Els valors s'expressen com el promig ± SE d'un mínim de 2000 cèl·lules de 3 tumors independents (Test de t-Student).

D'altra banda, vam voler determinar els nivells d'apoptosis en funció de l'origen dels tumors i del tractament *in vivo*. Els nivells de caspasa-3 determinats per immunofluorescència van ser baixos, tant en tumors generats a partir de cèl·lules no tractades com de cèl·lules irradiades. Així mateix tampoc vam trobar diferències entre els tumors dels animals tractats amb sèrum fisiològic o cetuximab (Figura 27). Aquest fet pot ser indicatiu de que l'apoptosi no juga un paper important en les variacions del creixement dels xenoempelts en aquest model experimental.



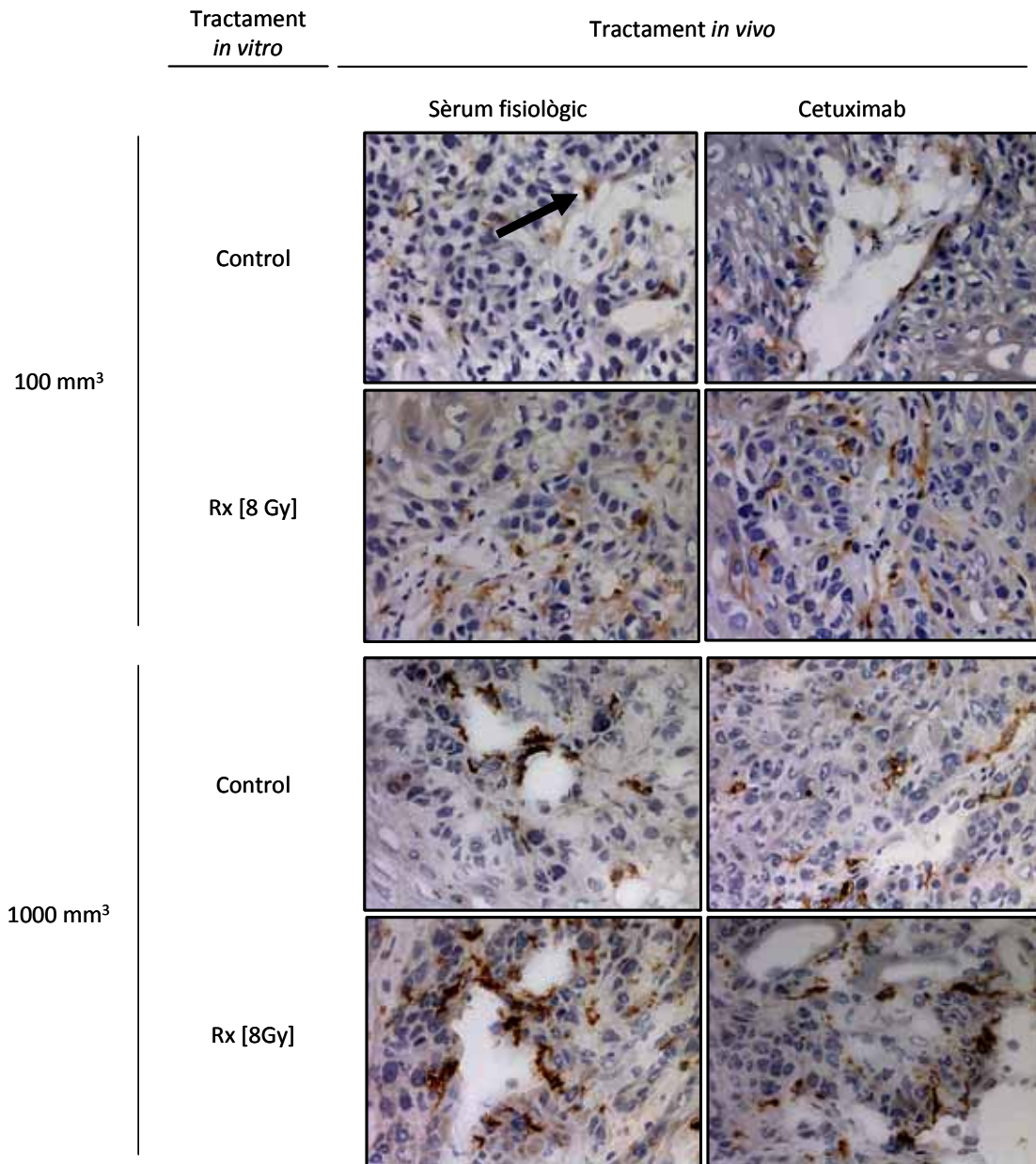
**Figura 27. Estudi de l'apoptosi cel·lular de tumors de 100 mm<sup>3</sup> derivats de cèl·lules irradiades i no irradiades.** Imatges obtingudes a 20x corresponents a immunofluorescències sobre seccions d'OCT de caspasa-3 (vermell) i d'un marcador nuclear (blau). Els ratolins es van tractar amb sèrum fisiològic o cetuximab 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. El grau d'apoptosi va ser despreciable en tots els tractaments.

### 2.2.3. Infiltració dels xenoempelts per macròfags

Diferents estudis experimentals amb adenocarcinomes primaris de mama han demostrat que els macròfags regulen el procés carcinogènic en un estadi tardà a través de les seves propietats proangiogèniques, secretant EGF al medi i proveint les cèl·lules epitelials

mamàries d'aquest factor. Basant-nos en aquestes observacions, vam decidir determinar si la resposta immune, concretament la infiltració per macròfags, podia associar-se a una major agressivitat tumoral. Amb aquesta finalitat vam realitzar una immunohistoquímica del marcador específic de macròfags F4/80 en estadis inicials ( $100 \text{ mm}^3$ ) i tardans ( $1000 \text{ mm}^3$ ) dels xenoempelets provinents de cèl·lules irradiades i no irradiades. Les preparacions, a més, també van ser avaluades per un patòleg especialista.

En general, la proporció de cèl·lules positives per al marcatge amb F4/80 respecte del total va ser baixa en tumors inicials. Tot i que la presència de macròfags semblava ser més elevada en tumors tardans, aquesta continuava essent poc representativa (Figura 28). D'altra banda, els macròfags estromals s'havien de diferenciar de les cèl·lules de Langerhans (macròfags habituals de la pell) segons el seu tamany, la forma del nucli (més gran i arronyonat) i del citoplasma (estrellat). Tot i que alguns macròfags es localitzaven al voltant dels vasos sanguinis, sembla ser que el tumor va créixer al voltant de la pell (degut a la injecció subcutània de les cèl·lules) i que no hi hauria hagut infiltració ni resposta quimiotàctica. Per aquests motius, es va considerar que les dades no eren valorables i no es va realitzar cap comptatge.



**Figura 28. Immunohistoquímica de F4/80 sobre seccions d'OCT de tumors derivats de cèl·lules irradiades i no irradiades.** Imatges obtingudes a 20x. Els ratolins es van tractar amb sèrum fisiològic o cetuximab 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. La sageta assenyala un macròfag (F4/80 positiu). La presència de macròfags va ser baixa tant en estadis tumorals inicials (100 mm<sup>3</sup>) com tardans (1000 mm<sup>3</sup>) i no es van observar diferències entre els tumors.

### 3. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA RESPOSTA INDUÏDA PER LA RADIACIÓ IONITZANT

El creixement accelerat dels xenoempelts i la caracterització microscòpica, especialment de Ki-67 i MVD, que vam observar són compatibles amb el desenvolupament d'una resposta cel·lular que podria haver estat induïda per la radiació. Aquesta resposta tindria per objectiu la promoció de la supervivència cel·lular per tal de contrarestar la citotoxicitat de la radiació ionitzant. Una de les conseqüències d'una resposta citoprotectora seria l'aparició de característiques malignes en els tumors procedents de cèl·lules irradiades, tal i com vam identificar en els nostres experiments.

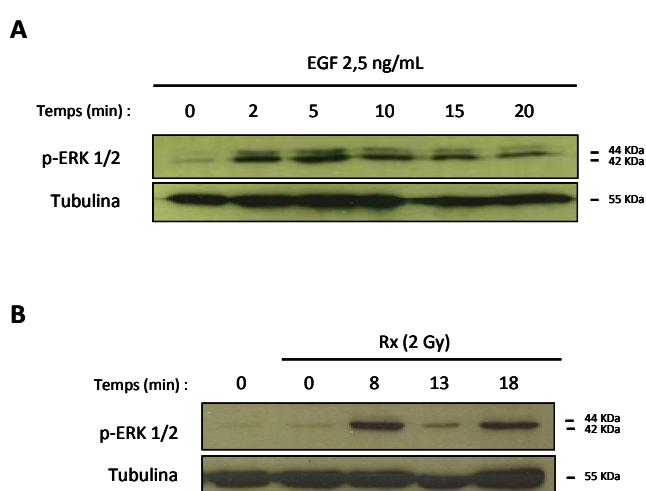
Per tal de confirmar la participació activa de la radiació ionitzant en la inducció d'aquest fenotip agressiu vam analitzar la influència de la radiació en la regulació de molècules implicades en la proliferació i la promoció cel·lular. La sospita de que EGFR s'associava al comportament agressiu (citoprotecció) dels tumors va ser suggerida pel clar efecte inhibidor del cetuximab i pel fet incontestable de la selectivitat i especificitat d'acció de l'anticòs sobre EGFR. Per aquest motiu vam prioritzar l'estudi de la regulació del propi EGFR, del lligand TGF- $\alpha$  i de la secreció del factor de creixement vascular VEGF-A, que podria explicar els canvis en l'angiogènesi. Finalment, també vam determinar si el principal efector de la secreció de VEGF, HIF-1 $\alpha$ , es veia modificat per la radiació.

#### 3.1. Activació del factor mitogènic ERK 1/2

L'activació de l'EGFR comporta l'activació de diferents vies de senyalització que són necessàries per la proliferació cel·lular, creixement i motilitat de les cèl·lules. Entre elles es troba la via d'EGFR-Ras-Raf-MAPK, la qual té com a efector final ERK 1/2 (quinasa regulada per factors extracel·lulars 1/2) ; quan aquest es fosforil·la es transloca al nucli i activa diferents factors de transcripció responsables de conduir la promoció i supervivència cel·lular, com per exemple VEGF. Per tal de determinar si la radiació ionitzant podia estimular l'activació d'ERK 1/2 en el nostre model, vam quantificar els nivells de fosforil·lació després de la irradiació de les cèl·lules.

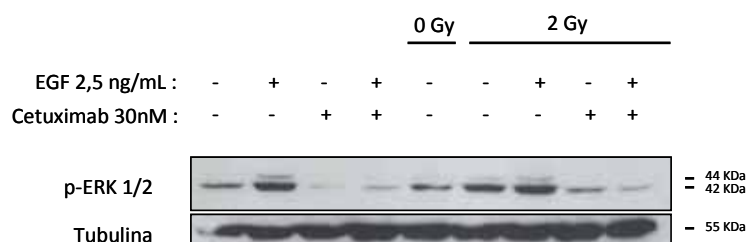
Primerament vam sotmetre les cèl·lules A431 a un experiment de *time course* amb el lligand natural del receptor del factor epidèrmic de creixement, l'EGF. El motiu era doble, per una banda assegurar l'estimulació de les nostres cèl·lules i, per l'altra, establir el moment de

màxima activitat enfront al lligand. Es van incubar les cèl·lules A431 durant diferents intervals de temps amb EGF 2,5 ng/mL i, com era d'esperar, vam trobar que les cèl·lules responien a l'estímul amb el lligand incrementant els nivells d'ERK 1/2 actiu (p-ERK 1/2), donant-se el pic de màxima activitat als 5 minuts (Figura 29A). Es va realitzar un altre experiment de *time-course* per corroborar l'activació d'ERK 1/2 per part de la radiació ionitzant descrita a la literatura. Amb aquesta finalitat es van irradiar els cultius amb 2 Gy i es van deixar incubar les cèl·lules a 37°C durant diferents intervals de temps. Es van observar dos pics de màxima activitat de la MAPK induïts per la radiació, als 8 min i als 18 min, donant-se una disminució de la proteïna entre aquest temps (Figura 29B).



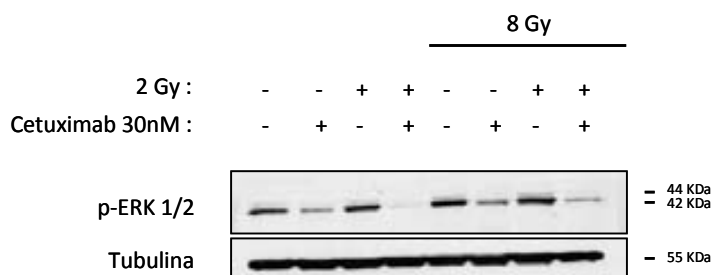
**Figura 29. Pics de màxima activitat de p-ERK 1/2 de les cèl·lules A431 exposades a EGF i radiació .** (A) Les cèl·lules A431 van ser estimulades amb 2,5 ng/mL d'EGF durant 0, 2, 5, 10, 15 o 20 minuts. Es va obtenir la màxima estimulació de p-ERK 1/2 als 5 minuts d'exposició. (B) Les cèl·lules A431 van ser estimulades amb radiació (2 Gy) i es van deixar incubar durant 0, 8, 13 o 18 minuts a 37°C. Es va obtenir la màxima estimulació de p-ERK 1/2 als 8 minuts d'exposició, seguida d'una davallada i d'un segon pic d'estimulació als 18 minuts. La tubulina es va incloure com a control intern

Seguidament, vam tractar les cèl·lules amb EGF, cetuximab 30 nM, radiació 2 Gy o una combinació de tots els agents. L'increment de p-ERK 1/2 induït pel lligand es va veure clarament inhibit amb el tractament amb cetuximab (Figura 30). D'altra banda, p-ERK 1/2 també va augmentar amb l'exposició a la radiació ionitzant (2 Gy), confirmant-se així que ERK 1/2 pot activar-se de manera independent de lligand i iniciar la transcripció de gens que promouen la proliferació cel·lular. Cetuximab, en canvi, continua inhibint el senyal radioinduit indicant que la resposta depèn, al menys en part, de l'activació de l'EGFR (Figura 30).



**Figura 30. Efecte de la radiació i cetuximab sobre l'expressió de p-ERK 1/2.** Les cèl·lules A431 van ser estimulades amb 2,5 ng/mL d'EGF durant 10 minuts en absència o presència de cetuximab (30 nM) i radiació (2 Gy). La radiació va activar p-ERK 1/2, que alhora es va veure inhibida per l'addició de cetuximab. La tubulina es va incloure com a control intern.

D'altra banda, per avaluar si la radiació ionitzant pot mantenir l'activació de p-ERK 1/2 al llarg del temps vam irradiar els cultius amb una dosi única de 8 Gy i, transcorregudes 24 hores, vam determinar els nivells de p-ERK 1/2. Es va confirmar que es mantenia l'activació de p-ERK 1/2 almenys 24 hores després de la irradiació (Figura 31). És més, quan es va administrar una dosi extra de 2 Gy vam observar encara un lleuger increment de la MAPK. Els experiments es van realitzar amb presència o absència de cetuximab 30 nM. En tots els casos, cetuximab va a inhibir l'estimulació d'ERK. Aquesta troballa suggereix que les cèl·lules irradiades no només mantenen una elevada transducció de senyals durant la irradiació sinó també que les cèl·lules que sobreviuen als raigs-X activen mecanismes de supervivència que engloben l'activació de la via d'EGFR.



**Figura 31. Efecte de la radiació i cetuximab sobre l'expressió de p-ERK 1/2.** Es van irradiar les cèl·lules A431 amb una dosi única de 8 Gy, es van incubar durant 24 hores i tot seguit es va administrar una dosi addicional de 2 Gy en absència o presència de cetuximab (30 nM). L'activació d'ERK 1/2 es va mantenir durant la irradiació fraccionada. La tubulina es va incloure com a control intern.

### 3.2. Inducció de la transcripció d'EGFR, TGF- $\alpha$ , VEGF i HIF-1 $\alpha$

#### 3.2.1. En la malaltia microscòpica residual

Per validar si el creixement accelerat i l'elevada densitat en el nombre de vasos que vam observar en els xenoempelts estava associada als canvis produïts per la radiació, vam

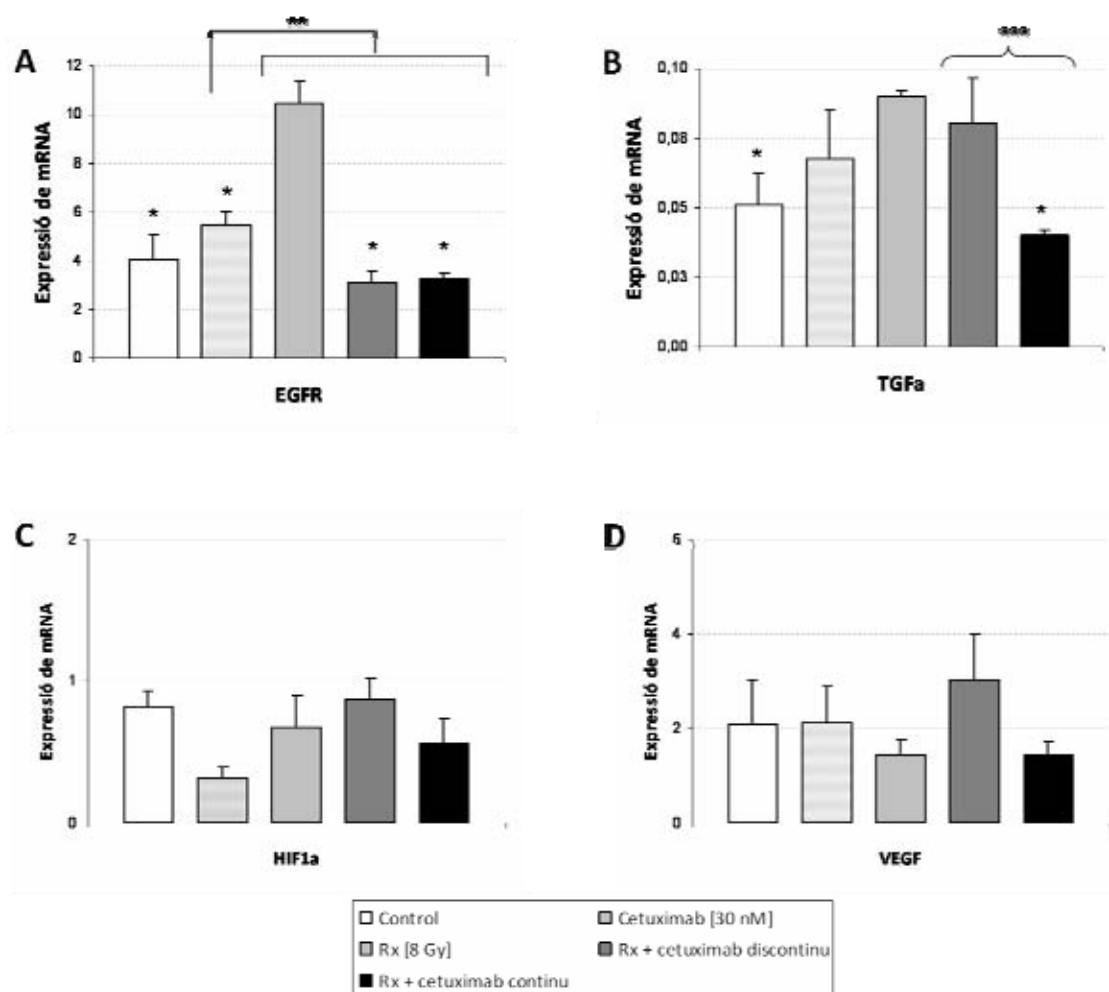
determinar en primer lloc els nivells d'expressió d'*EGFR*, *TGF- $\alpha$* , *HIF-1 $\alpha$*  i *VEGF* en funció del tractament que van rebre les cèl·lules abans de ser injectades als ratolins atímics, és a dir, vam mesurar directament la inducció de canvis en la regulació de la transcripció en la MMR.

Seguint els procediments descrits en l'apartat de materials i mètodes, es va obtenir RNA total, es va retrotranscriure a cDNA i es van quantificar les còpies de mRNA de cada gen. La quantificació d'aquests gens ens va permetre confirmar que, després de l'exposició a la radiació ionitzant en el nostre disseny experimental, les cèl·lules supervivents (MMR) mostraven un increment significatiu ( $p=0.01$ ) en l'expressió d'*EGFR* comparat amb les no irradiades (Figura 32A). D'altra banda, és interessant el bloqueig d'aquest augment d'expressió quan cetuximab estava present en el medi de cultiu en combinació amb la radiació, tant de manera contínua com discontinua ( $p=0.011$  en ambdós casos) (Figura 32A).

De forma similar, el lligand *TGF- $\alpha$*  estava sobreexpressat en les cèl·lules irradiades ( $p=0.033$ ), tot i que el bloqueig de la seva expressió només esdevenia significatiu quan les cèl·lules es van mantenir amb un tractament continu amb cetuximab ( $p=0.011$ ) (Figura 32B). En aquest cas es va observar la importància de l'esquema d'administració de cetuximab, ja que si aquest es retirava del medi de cultiu després de la última dosi de radiació (tractament amb cetuximab discontinu), l'expressió del lligand no es veia disminuïda, contràriament del que passava si l'anticòs es mantenia fins el moment de la injecció de les cèl·lules en els ratolins atímics.

En el cas de *VEGF* i *HIF-1 $\alpha$*  no es van observar diferències significatives (Figura 32C i 32D). En tots els casos els valors d'expressió relativa es van normalitzar amb el gen de referència *GAPDH*.



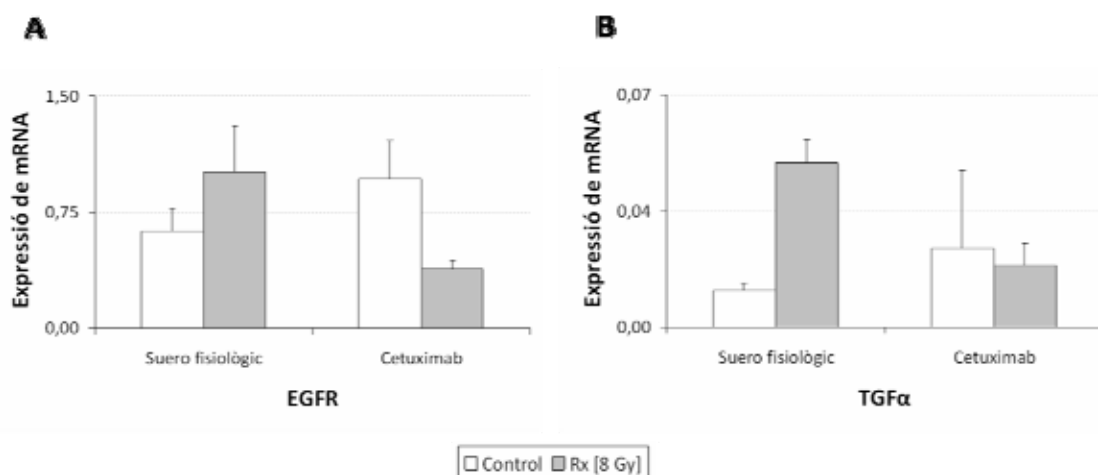


**Figura 32.** Nivells d'expressió dels gens *EGFR*, *TGF-α*, *HIF-1α* i *VEGF* analitzats en els cultius en el moment previ a la injecció de les cèl·lules en els ratolins atímics. Seguint l'esquema d'obtenció de malaltia microscòpica residual les cèl·lules A431 es van tractar amb cetuximab, radiació o una combinació dels dos agents. Les gràfiques mostren els nivells d'expressió relativa dels gens en funció dels valors del gen normalitzador o *housekeeping* (*GAPDH*). La radiació ionitzant va induir un augment en l'expressió d'*EGFR* (A) i *TGF-α* (B), que alhora es va bloquejar amb l'addició de cetuximab. No es va observar cap canvi significatiu en l'expressió d'*HIF-1α* (C) i *VEGF* (D). Els valors corresponen al promig  $\pm$  SE de 3 experiments independents amb 2 rèpliques per experiment. \* $P < 0.05$  comparat amb les cèl·lules que reben radiació sola. \*\* $P = 0.01$  comparat amb el tractament amb cetuximab. \*\*\* $P < 0.05$  comparació entre els cultius on es combinava la radiació amb cetuximab continu i discontinu (Test de Mann-Whitney).

### 3.2.2. En els xenoempelts

Donat que un dels mecanismes involucrats en la resposta citoprotectora induïda per la radiació ionitzant era la regulació positiva dels gens *EGFR* i *TGF-α*, vam examinar si en els xenoempelts es mantenia aquest tret de malignitat. Una vegada injectades les cèl·lules (MMR), es va procedir a determinar els nivells de transcripció d'aquests gens en totes les sèries de xenoempelts, tant en estadis tumorals inicials (100 mm<sup>3</sup>) com finals (1000 mm<sup>3</sup>).

En els ratolins control, l'expressió d'ambdós gens va ser superior en els xenoempelts procedents de cèl·lules irradiades. Cetuximab administrat *in vivo* va disminuir aquests nivells, fet que correlaciona positivament amb les dades dels experiments *in vitro*, on cetuximab inhibia consistentment la proliferació de les cèl·lules A431 (Figura 33). En el cas de *VEGF* i *HIF-1 $\alpha$*  no es van observar diferències significatives.



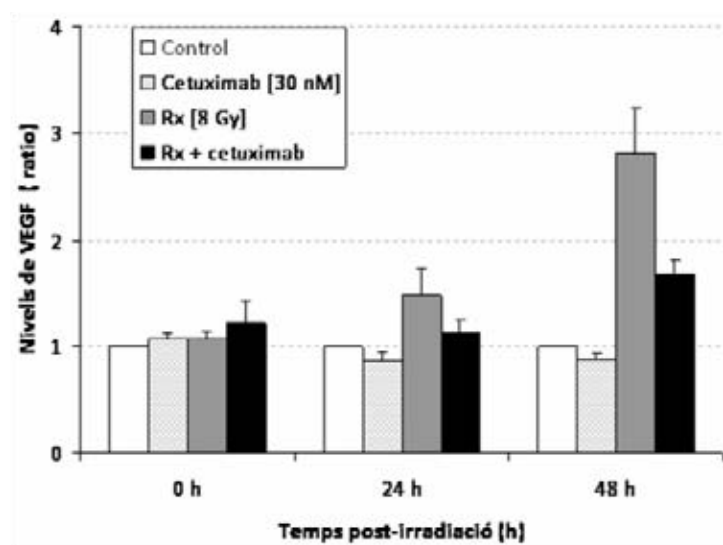
**Figura 33. Nivells d'expressió dels gens *EGFR* (A) i *TGF- $\alpha$*  (B) en xenoempelts de 1000 mm<sup>3</sup> procedents de cèl·lules no tractades (control) i irradiades.** Les gràfiques mostren els nivells d'expressió dels gens en funció dels valors del gen normalitzador o *housekeeping* (*GAPDH*). L'expressió d'*EGFR* i *TGF- $\alpha$*  observada *in vitro* es va mantenir en els xenoempelts, i a la vegada es va bloquejar per l'acció de cetuximab. Els ratolins atòmics es van randomitzar per a rebre serum fisiològic o cetuximab 0,05 mg/animal cada 3,5 dies. Els valors corresponen al promig  $\pm$  SE de 3 experiments independents amb 3 tumors per experiment. No es van observar diferències estadísticament significatives (Test de Mann-Whitney).

Els tumors generats en el nostre model animal són d'origen humà però tota la vasculatura i l'estroma tumoral és d'origen murí. Aquesta característica ens proporciona un avantatge enfront a altres models ja que podem distingir quina és l'aportació del tumor i quina la de l'estroma mitjançant el disseny d'oligonucleòtids que amplifiquen de forma selectiva el component humà o de ratolí dels tumors xenoempeltats. Així, vam realitzar també una quantificació de l'expressió gènica de les cèl·lules estromals de ratolí la qual va resultar tan baixa, no va ser possible la seva detecció i quantificació.

### 3.3. Secreció de VEGF

L'associació entre la radiació ionitzant i l'increment de la densitat vascular ens va portar a comprovar si un dels principals factors pro-angiogènics, el VEGF, era estimulat per la radiació. Per aquesta raó es van tractar les cèl·lules A431 amb raigs-X amb una dosi de 8 Gy, cetuximab 30 nM o una combinació dels dos agents i es va recollir el sobrenedant dels cultius a

les 0 h, 24 h i 48 h post-tractament. Es va determinar la quantitat de VEGF secretat al medi mitjançant la tècnica ELISA.



**Figura 34. La radiació va induir la secreció de VEGF.** Les cèl·lules A431, en creixement exponencial, es van irradiar amb una única dosi de 8 Gy. Cetuximab es va afegir al medi de cultiu prèviament a la irradiació amb 8 Gy. Els sobrenedants es van recollir després del tractament amb radiació i a les 24 h i 48 h. La concentració de VEGF es va determinar amb la tècnica ELISA i els resultats es van normalitzar pel número de cèl·lules comptades en cada temps. Els valors s'expressen com el promig  $\pm$  SE de 2 experiments independents amb dues rèpliques cadascun.

La radiació ionitzant va induir la secreció de VEGF en les cèl·lules A431. Els nivells presents en el sobrenedant dels cultius irradiats amb 8 Gy van patir un pic de màxima estimulació a les 48 hores de l'aplicació dels raigs-X, per un factor de 2,82 vegades, tot i no assolir la significança estadística. El tractament amb cetuximab prèviament a la radiació va inhibir notablement aquesta secreció (Figura 34).

### 3.4. Caracterització genòmica

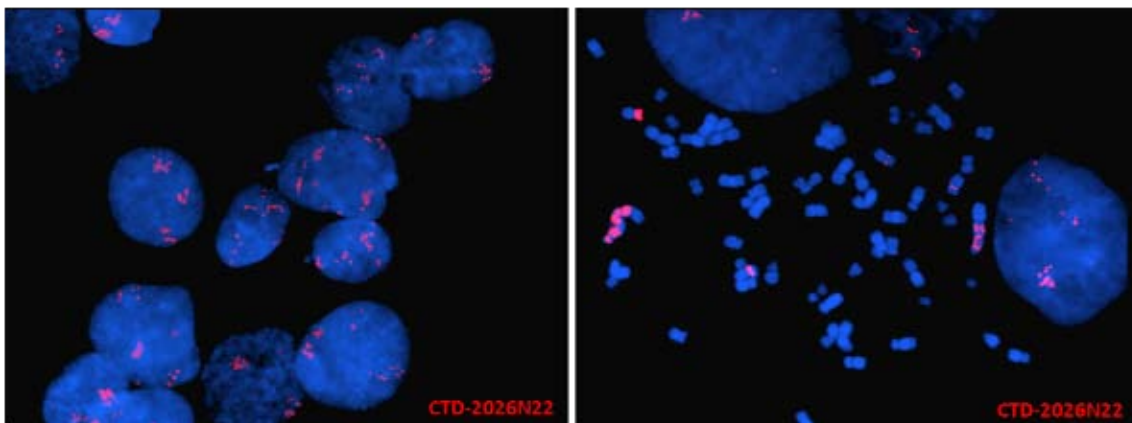
La identificació d'un fenotip tumoral agressiu (creixement accelerat) induït per la radiació es va poder explicar tant des d'un punt de vista morfològic (proliferació cel·lular i angiogènesi elevades) com des d'una vessant molecular (sobreexpressió de la via EGFR-MAPK-ERK 1/2). Amb l'objectiu d'esbrinar si durant la generació de la MMR es va produir alguna modificació a nivell genètic, vam investigar mitjançant tècniques de citogenètica molecular l'aparició de guanys o pèrdues en el gen d'*EGFR*.

### 3.4.1. Determinació de l'amplificació del gen d'*EGFR*

El nombre de receptors d'EGF presents en les cèl·lules no neoplàsiques és d'entre 40.000 i 100.000 receptors per cèl·lula. En les cèl·lules tumorals aquest valor pot augmentar en un ordre de magnitud essent la causa més freqüent l'amplificació del gen d'*EGFR*.

Per tal de comprovar si la sobreexpressió del receptor en les nostres cèl·lules tumorals era deguda a una amplificació, vam realitzar una hibridació *in situ* fluorescent (FISH) de la regió on es localitza el gen d'*EGFR*, concretament a 7p11.2. El resultat va ser clar, la línia tumoral A431 utilitzada té el gen d'*EGFR* amplificat, amplificació visible tant en nuclis interfàsics com metafàsics (Figura 35).

Aquesta línia tumoral és hipertriploide, i en el 36% de les cèl·lules el número modal cromosòmic va ser de 74. Això implica que en el cultiu cel·lular hi ha presents clons amb dotacions genètiques diferents. Així vam observar la presència de nuclis normals amb 2 còpies del gen de l'*EGFR* i d'altres amb un número variable d'amplificacions. L'existència en els cultius cel·lulars de subpoblacions millor dotades quant a la dosi gènica d'*EGFR*, ens va fer pensar que una selecció clonal induïda pel tractament amb radiació en combinació amb cetuximab podria explicar el fenotip agressiu de determinats tumors i l'aparició de la resistència desenvolupada *in vitro*. Per aquest motiu vam determinar els canvis en el nombre de còpies d'*EGFR* després dels tractaments.



**Figura 35. Anàlisi per FISH del receptor del factor epidèrmic de creixement en les cèl·lules A431.** Es va utilitzar la sonda de locus específica CTD-2026N22 (en color vermell) on s'observa amplificació de la regió 7p11.2 del gen de l'*EGFR*.

Es van tractar les cèl·lules amb cetuximab durant 8 dies [30 nM], radiació [8 Gy administrant 2 Gy / 24 h] i una combinació dels 2 agents amb les mateixes dosis. La duració total dels cultius *in vitro* va ser d'11 dies. Transcorregudes 24 hores de la última dosi de radiació es va obtenir el *pellet* de tots els cultius i es va realitzar la tècnica de FISH. Degut a l'elevat nombre de senyals i a la proximitat entre elles no va ser possible el seu comptatge, per aquest motiu vam decidir establir uns criteris inicials de classificació, que van ser:

1. Mida de l'agrupació de senyals: gran ( $\geq 10$  senyals) o petita ( $< 10$  senyals)
2. Tipus d'agrupació de senyals: laxa o compacta
3. 1 o 2 senyals

Es van comptar un total de 100 nuclis per cada tractament. Tot i que es va observar una tendència a la disminució del número de senyals amb el tractament amb cetuximab les diferències no van ser significatives (Figura 36).

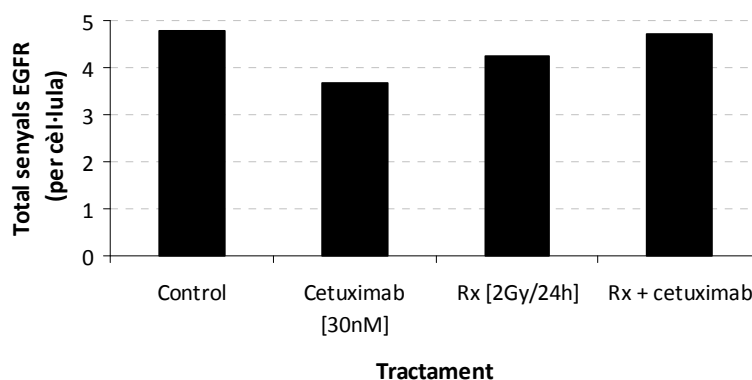
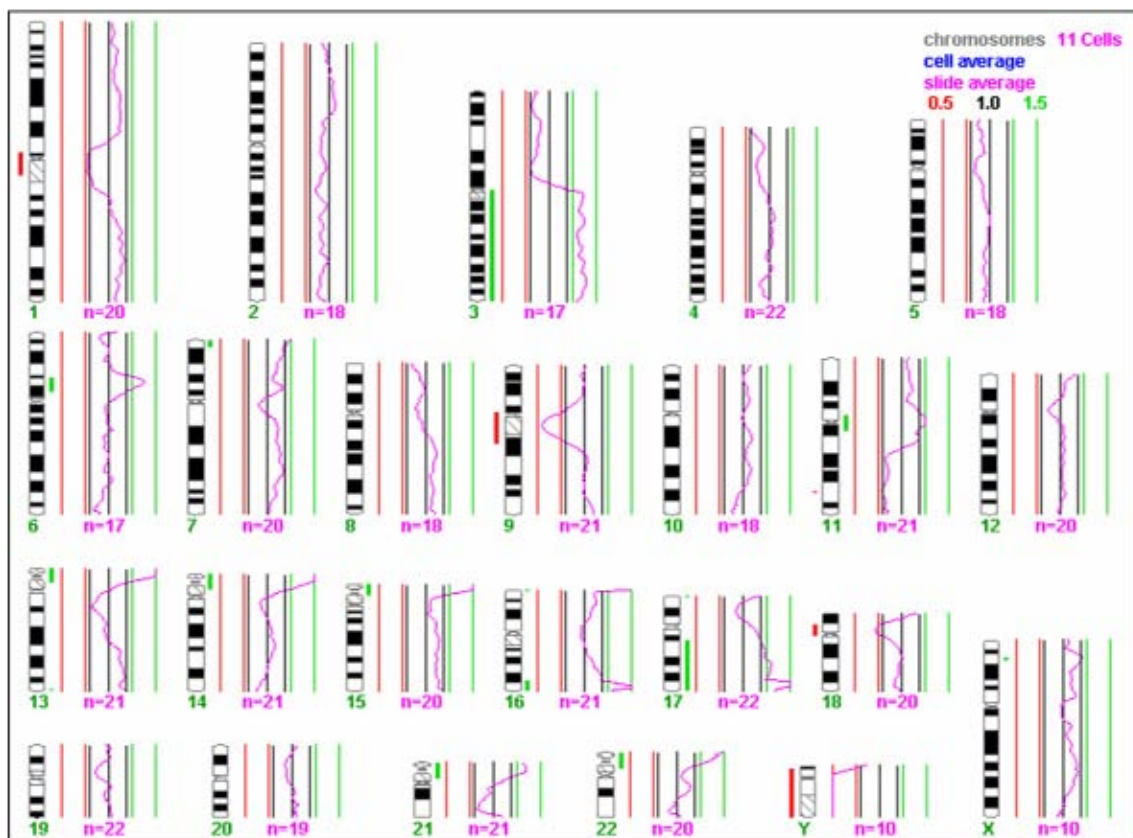


Figura 36. Número de senyals d'*EGFR* per cèl·lula.

### 3.4.2. Determinació de desequilibris genòmics

Com que en la MMR resultant després dels tractaments amb radioteràpia i cetuximab no vam poder observar un genotip característic, vam decidir aprofundir en la complexitat de l'anàlisi genòmic utilitzant la tècnica de la hibridació genòmica comparada (CGH). D'aquesta manera, a més de centrar-nos en l'*EGFR*, també ens permetria saber si existeixen canvis de dosi gènica en altres regions del genoma implicades en el fenotip agressiu derivat de les cèl·lules irradiades.

En primer lloc vam caracteritzar la nostra línia cel·lular per poder avaluar, *a posteriori*, possibles canvis originats pels tractaments. En aquest sentit, vam realitzar un mínim de cinc experiments de CGH de les cèl·lules A431 a nivell basal (sense estar sotmeses a cap tractament) i en tots els casos el resultat va ser el mateix; es van observar guanys de 3q, 6p21.1p12.2, 11p11.2q12.2, 17q12qter i Xq22.12 i pèrdues de 11q23.3 i de Y (Figura 37) (Taula 15). Tot i que la línia tumoral té el gen d'EGFR sobreexpressat, no vam observar cap guany en la regió on està localitzat (7p11.2). Aquest fet pot ser atribuïble a la resolució de la tècnica, ja que els guanys es detecten quan les regions implicades són superiors a 5-10 Mb. La pèrdua del cromosoma Y ens va servir com a control intern ja que la línia tumoral A431 va ser establerta a partir d'una dona, per tant, en hibridar-se amb un DNA control sobre metafases normals 46,XY havíem d'esperar una pèrdua en el cromosoma Y, tal i com vam observar. Degut a que les regions centromèriques, telomèriques, els blocs d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9 i 16 i els cromosomes 19 i 22 són susceptibles de donar falsos positius, no els vam tenir en compte en el nostre estudi.



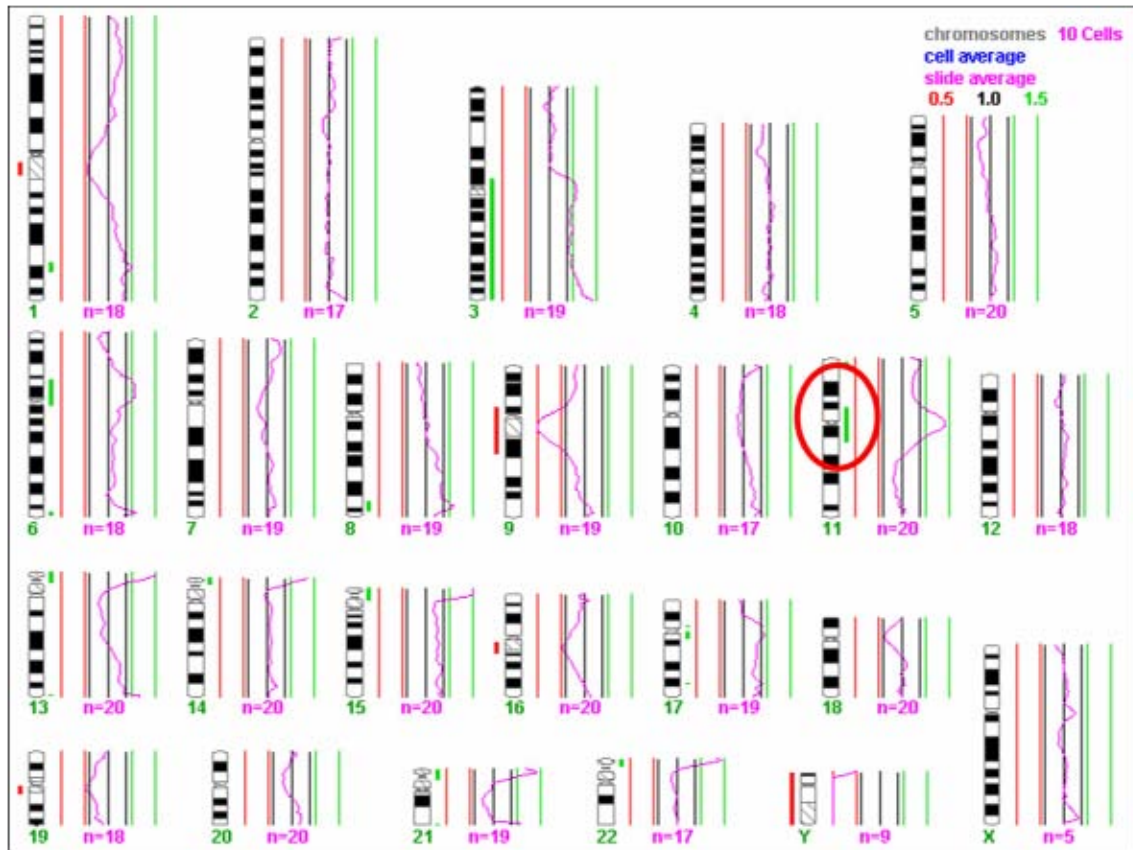
**Figura 37. Anàlisi per CGH de la línia cel·lular A431.** El perfil mostra els desequilibris de base que inclouen pèrdues en 11q23.3 i Y (vermell) i guanys en 3q, 6p21.1p12.2, 11p11.2q12.2, 17q12qter i Xq22.12 (verd).

**Taula 15. Alteracions genòmiques detectades en la línia A431 en condicions basals.**

Cromosoma	A431	
	Guanys	Pèrdues
1	-	-
3	3q	-
6	6p21.1p12.2	-
8	-	-
11	11p11.2q12.2	11q23.3
17	17q12qter	-
X	Xq22.12	-
Y	-	Y

Seguidament, per determinar si el tractament amb cetuximab [30 nM], radiació [8 Gy] o la combinació dels 2 agents havia causat variacions en la dosi gènica, vam hibridar els DNAs d'aquestes cèl·lules amb un control 46,XY. En els 3 casos es van observar les mateixes alteracions que presentava la línia basament (sense tractament), indicant que el tractament no exerceix cap efecte a nivell genòmic. Només en el cas del tractament combinat es va observar una petita variació on la regió 11p11.2q12.2 (que ja es guanyava basament) s'ampliava per incloure una regió més gran, 11p11.2q13.2 (Figura 38).

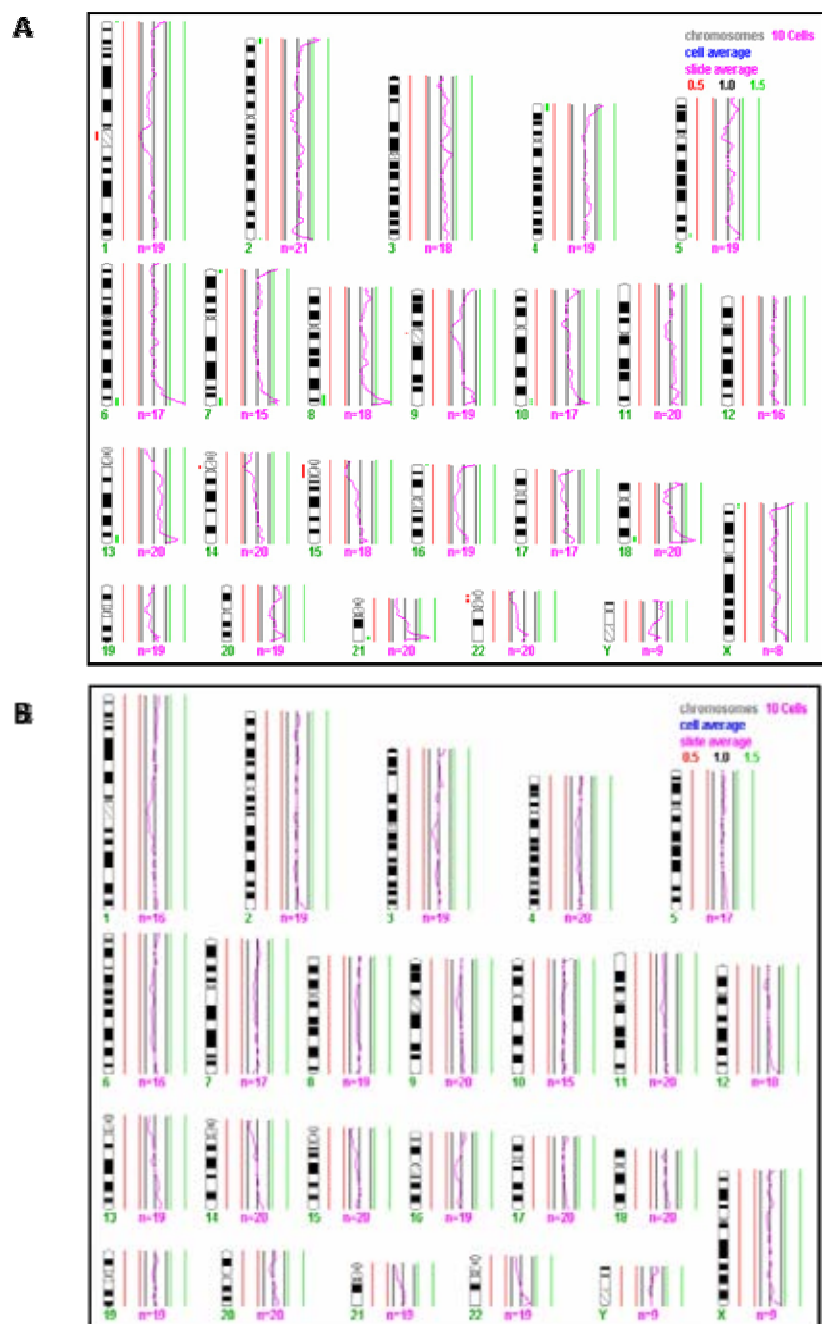
Una vegada establertes les alteracions de base, vam voler corroborar que el tractament no causava desequilibris en la dosi gènica. Amb aquest motiu vam hibridar les cèl·lules en condicions basals (marcades amb *Spectrum Green-FITC*) amb A431 tractades amb cetuximab [30 nM], radiació [8 Gy] i una combinació dels 2 agents (marcats amb *Texas Red-dUTP*). El que aconseguíem hibridant competitivament la línia tumoral basal amb la línia tractada era no tenir en compte les alteracions basals de la línia A431 i visionar directament els guanys o les pèrdues atribuïbles directament al tractament.



**Figura 38.** Anàlisi per CGH de la línia cel·lular tractada amb la combinació de cetuximab i radiació. El perfil mostra els desequilibris propis de la línia A431 en condicions basals

Com vam poder observar en els perfils finals, totalment rectes, ni la radiació ni cetuximab aplicats per separat van tenir un efecte en aquest sentit (Figura 39). En el cas del tractament combinat, però, hi va haver una variació en els perfils de manera que es va observar més hibridació del color verd en 1p13 i 11p11.2q12.1, indicant un desequilibri en la dosi (Figura 40). Tot i que hi ha una tendència a adquirir el guany del cromosoma 1 en el perfil de la línia basal, només es fa patent en aquest cas. Aquests resultats corroboren les troballes anteriors, on els agents per separat no indueixen cap efecte, mentre que el tractament combinat podria seleccionar positivament els clons amb els guanys en 1p13 i 11p11.2q12.1. En cap cas es va observar guanys o pèrdues en 7p11.2, que inclou *EGFR* (Figura 41).





**Figura 39.** Anàlisi per CGH de les cèl·lules A431 tractades amb cetuximab (A) i radiació (B) versus les A431 basals. Els perfils no mostren cap desequilibri significatiu respecte les cèl·lules en condicions basals.

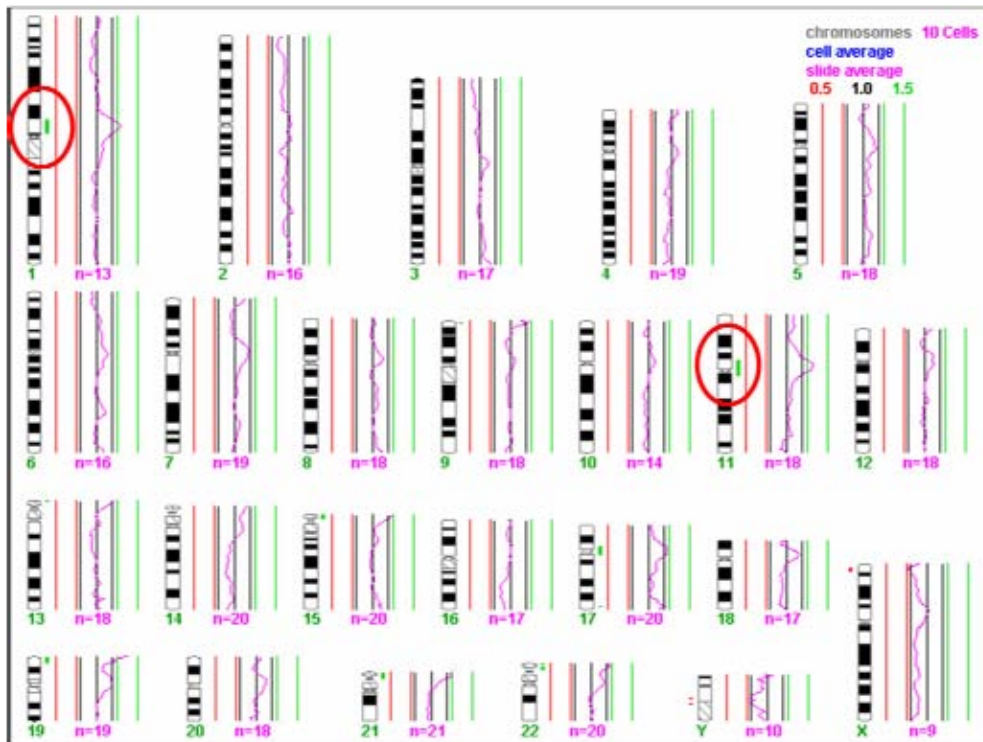


Figura 40. Anàlisi per CGH dels cultius tractats amb la combinació de cetuximab i radiació versus les A431 basals. El perfil mostra canvis en la dosi de 1p13 i 11p11.2q12.1 respecte les cèl·lules en condicions basals.

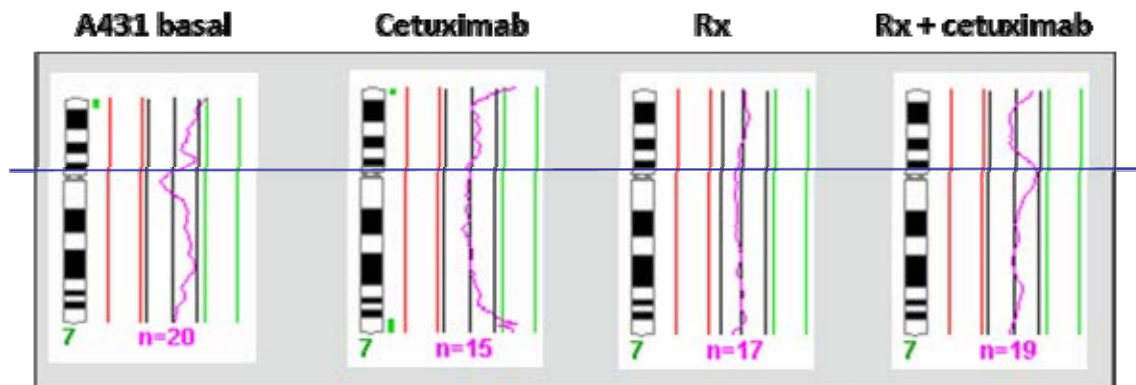
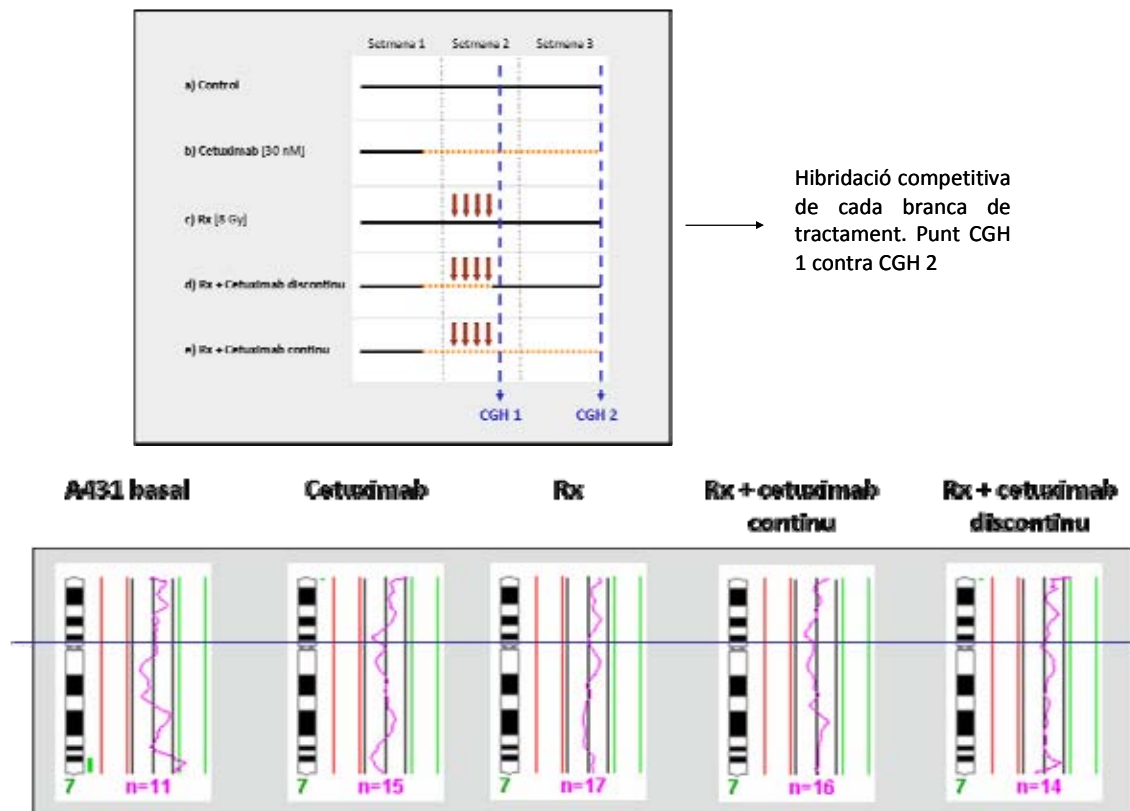


Figura 41. Perfils de CGH del cromosoma 7. *EGFR* es troba localitzat a 7p11.2 (línia blava). No s'observa cap guany o pèrdua en cap regió del cromosoma.

Finalment, vam avaluar una possible selecció clonal dels cultius al llarg del temps. Amb aquesta finalitat es va obtenir DNA de les cèl·lules A431 després d'allargar 10 dies els cultius, amb o sense l'addició de cetuximab (Figura 42). Vam hibridar els DNA d'aquest punt (CGH 2) amb els corresponents del punt CGH 1. En cap cas vam trobar diferències en els perfils, incloent la regió d'*EGFR* (Figura 42), de manera que no es va poder explicar l'adquisició de resistència per canvis genètics a cetuximab en el nostre model experimental.



**Figura 42. Perfils de CGH del cromosoma 7.** (Superior) Es van hibridar els DNAs del punt 1 amb els del punt 2 de cada branca de tractament. (Inferior) *EGFR* es troba localitzat a 7p11.2 (línia blava). No s'observa cap guany o pèrdua en cap regió del cromosoma al llarg del temps de tractament.



**Discussió**



Les cèl·lules tumorals poden adquirir la capacitat de proliferar de manera autònoma a través de la producció desregulada de factors de creixement i dels seus receptors. La majoria dels càncers epitelials es caracteritzen per una activació funcional de la família de receptors del factor epidèrmic de creixement (EGFR), fet que promou la supervivència cel·lular i confereix un caràcter agressiu a les cèl·lules tumorals (Ciardiello and Tortora, 2008).

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat determinar si el manteniment del bloqueig de l'EGFR amb cetuximab una vegada finalitzada la radioteràpia podria continuar inhibint les cèl·lules tumorals residuals, que hom considera responsables de les recidives post-radioteràpia.

### **El model experimental *in vitro* – *in vivo***

Els tumors sòlids són bàsicament un sistema d'òrgans aberrant amb una diversitat de cèl·lules neoplàsiques amb una vasculatura formada, cèl·lules inflamatòries i elements estromals. En oncologia, la radioteràpia és el tractament no quirúrgic més efectiu i, ja sigui per si sola o combinada amb la cirurgia i/o la quimioteràpia, s'assoleix una bona resposta local en un elevat percentatge de casos. El control tumoral permanent requereix un control 100% efectiu de les cèl·lules neoplàsiques; però el cert és que la persistència d'una petita fracció de cèl·lules tumorals (que utilitzarien mecanismes de supervivència -resistència- molt efectius) explica l'aparició de recidives locals malgrat haver-se assolit en primera instància una resposta completa.

En aquesta investigació hem utilitzat les cèl·lules A431 com a model de tumorigènesi. La línia tumoral A431, originada en un carcinoma escamós, sobreexpressa l'EGFR. Aquest fet, junt amb que la via d'EGF es troba hiperactivada en cèl·lules iniciadores de tumor (Rich, 2007), va ser clau per triar aquesta línia com a model. La qüestió que ens vam plantejar va ser si el bloqueig de l'EGFR podria frenar la progressió tumoral d'una població cel·lular supervivent a la radioteràpia, la qual podria imitar les recaigudes després d'un tractament oncològic. Per aproximar-nos a aquest concepte vam administrar el tractament oncològic *in vitro*, vam deixar passar temps per permetre que les cèl·lules tumorals executessin els seus programes d'adaptació-resistència (com ho podrien fer en un tumor) i finalment vam injectar les cèl·lules en el teixit subcutani de ratolins atímics per observar la formació de tumors (recidives, en el context clínic). Les cèl·lules que vam injectar als ratolins es van caracteritzar per ser resistents al tractament administrat i per haver repoblat els cultius, tal i com es dona en les recidives. A

més, vam determinar en quina proporció aquestes cèl·lules resistents eren clonogèniques, propietat essencial de les cèl·lules iniciadores de tumor.

Aquest disseny pot imitar el que creiem que passa en el món real abans de diagnosticar les recidives. És un disseny que ens pot servir per aproximar-nos al fet biològic i un instrument per fer intervencions terapèutiques i per entendre els mecanismes implicats en els resultats dels tractaments.

A part de la visió general del model hi ha dos aspectes que mereixen ser comentats específicament.

### 1.- Injecció de cèl·lules clonogèniques i de cèl·lules no clonogèniques

El animals es van injectar amb un número determinat de cèl·lules clonogèniques i no clonogèniques. No es va procedir a la separació de les dues poblacions sinó que es va injectar un número fixe de cèl·lules clonogèniques (95.000) ajustant el nombre total de cèl·lules en funció de l'eficàcia del tractament *in vitro*. Vam aplicar aquest criteri per fer comparables els esquemes de tractament pre-implant. Si haguéssim injectat sempre el mateix número de cèl·lules totals, podríem haver atribuït un possible retard de creixement tant a les diferències en el número de cèl·lules clonogèniques com a l'acció de cetuximab, confusió que volíem evitar.

Per contra, l'alternativa que vam decidir té un clar peatge. Per mantenir constant el número de cèl·lules clonogèniques vam injectar també cèl·lules no clonogèniques, no podent-se descartar la seva cooperació en el desenvolupament dels tumors, actuant a modus de *feeder cells*. Aquest comentari és rellevant perquè els tumors derivats de cèl·lules irradiades van ser els més agressius, agressivitat que podríem atribuir tant a la radiació administrada com a un simple efecte *feeder*.

### 2.- Els efectes dels tractaments no van modificar el teixit d'origen murí

L'elevada tumorogènicitat de les cèl·lules A431 indica que l'estroma murí va proporcionar les condicions necessàries pel desenvolupament i la progressió tumoral. El fet de que els ratolins no s'irradiessin i de que cetuximab actua específicament contra cèl·lules humanes, ens va permetre excloure la interferència de l'estroma en el moment d'avaluar els efectes dels tractaments sobre les cèl·lules tumorals. Així, va ser possible determinar l'efecte de la irradiació sobre la vascularització dels tumors prescindint de l'efecte de la radioteràpia



sobre les cèl·lules endotelials murines. D'altra banda, qualsevol canvi observat en l'estroma es va poder imputar a un efecte derivat exclusivament de les cèl·lules tumorals. Es podria criticar que no s'hagi seleccionat la malaltia microscòpica residual directament en xenoempelts (procés altament complex), però creiem que aquest disseny compleix l'objectiu d'avaluar directament l'efecte i els mecanismes d'acció dels tractaments sobre la vitalitat i agressivitat de les cèl·lules tumorals *per se*.

### **Eficàcia de cetuximab en l'adjuvència**

L'anticòs monoclonal anti-EGFR cetuximab (C225), que ha estat objecte del nostre estudi, s'uneix específicament a la regió extracel·lular del receptor i bloqueja la transmissió de senyals cel·lulars que promouen la supervivència i la resistència a la radioteràpia.

Actualment la combinació de cetuximab i radioteràpia es considera l'estàndard en el tractament del càncer escamós de cap i coll localment avançat, havent-se demostrat en aquesta localització que prolonga la supervivència (Bonner et al., 2006). Cal observar que la radioteràpia i cetuximab s'administren simultàneament per maximitzar la interacció d'aquests dos agents. De fet, els resultats clínics han confirmat definitivament que cetuximab exerceix un important paper antitumoral quan es combina amb radioteràpia. Un pas més en l'explotació antitumoral del bloqueig de l'EGFR es podria donar si es demostrés que les cèl·lules tumorals responsables de les recidives post-radioteràpia són dependents (addictes) de l'EGFR. Per aquest motiu, i de manera creixent, el tractament de manteniment o adjuvència amb l'anti-EGFR després de radioteràpia està essent avaluat. Així, en alguns estudis preclínic contemporanis al nostre s'ha observat que l'administració de cetuximab durant i després de la radioteràpia millora el control local comparat amb la radiació sola (Baumann et al., 2007; Baumann et al., 2003; Krause et al., 2004; Krause et al., 2006; Milas et al., 2007).

No obstant, a diferència del nostre estudi, en els treballs publicats fins ara el model ha consistit en l'administració de cetuximab enfront a tumors ja desenvolupats. En el nostre cas vam començar el tractament *in vivo* en el moment de la injecció de la MMR seleccionada *in vitro*. El motiu era clar ja que l'objectiu que perseguíem era avaluar el paper adjuvant de l'anticòs sobre el retard en l'aparició de xenoempelts (imitant les recidives locals) i no sobre el control tumoral pròpiament dit. Utilitzant aquest model experimental hem pogut demostrar que els xenoempelts derivats de cèl·lules tumorals pretractades responen significativament al bloqueig de l'EGFR amb una disminució del creixement del tumor. Aquesta observació és

interessant ja que, com a prova de concepte, pot ser utilitzada de base pel disseny d'assaigs clínics.

Alguns aspectes relacionats amb els resultats d'eficàcia de la combinació de la radioteràpia i cetuximab requereixen una atenció especial.

#### 1.- *In vitro*. Adaptació i/o selecció cel·lular enfront a cetuximab

Crida l'atenció que en contra del que indiquen els resultats *in vivo*, les cèl·lules en cultiu es van insensibilitzar a cetuximab. En primer lloc cal assenyalar que les cèl·lules A431 van respondre a cetuximab de forma previsible segons les dades existents a la literatura. No obstant, quan els cultius es van sotmetre a una exposició relativament perllongada es va observar una insensibilització a l'anticòs. Els resultats *in vitro* suggereixen que durant el cultiu sostingut es va produir una adaptació i/o una selecció d'una determinada població cel·lular que no necessita els senyals d'EGFR per proliferar *in vitro*. Quan aquesta població insensible va repoblar els cultius, la clonogenicitat no es va veure afectada per la presència de cetuximab. Aquesta hipòtesi es veu avalada pel fet de que en aquestes cèl·lules és possible obtenir una població estable resistent a cetuximab, tal i com s'ha establert recentment en el nostre laboratori. Per altra banda, abans d'assolir una resistència estable, hem observat que les cèl·lules passen per un estadi de resistència transitòria, que és exactament el que vam veure en aquest model. Una dosi baixa i un temps curt d'exposició a cetuximab expliquen la transitorietat de la resistència observada quan l'anticòs es va reintroduir durant la formació de colònies, on es va observar una re-sensibilització al bloqueig d'EGFR.

Un resultat que requereix atenció és l'aparent manca de sinergisme de cetuximab associat amb la radioteràpia. No es va observar un benefici a l'addicionar l'anticòs durant la irradiació, resultat consistent amb la insensibilització prèviament descrita. En canvi, quan es va administrar cetuximab durant la formació de colònies en cèl·lules irradiades exclusivament, o si s'havia discontinuat l'anticòs, es va observar un increment d'eficàcia significatiu, confirmant l'existència d'una radiosensibilització per cetuximab, tal i com està clarament descrit en la literatura.

La resistència al bloqueig de dianes implicades en la transducció de senyals és freqüent. Referent a cetuximab, s'han descrit diferents mecanismes d'escapada, entre ells la desregulació en el procés d'ubiquitinització d'EGFR, l'amplificació de les senyals d'erbB-3, l'increment de TGF- $\alpha$ , una angiogènesi alterada i un major transport d'EGFR al nucli (Hung et

al., 2008; Lo and Hung, 2006; Lu et al., 2007a; Rajput et al., 2007; Vilorio-Petit et al., 2001; Wheeler et al., 2008). Més recentment, s'ha demostrat que algunes cèl·lules que han desenvolupat resistència a cetuximab tenen incrementada l'activitat tirosina-quinasa de les proteïnes que integren la família SRC, fet que va unit a la translocació del receptor al nucli (Li et al., 2009). L'EGFR nuclear s'ha detectat en teixits amb una elevada proliferació i s'ha correlacionat amb mal pronòstic en càncer de mama, orofaringe i ovari (Pysrri et al., 2005; Xia et al., 2009).

La identificació de mecanismes de resistència és clínicament rellevant donat que és el primer pas per superar la insensibilitat a cetuximab que s'observa en una proporció significativa de pacients en algun moment del tractament (Arteaga, 2003; Bianco et al., 2005; Vilorio-Petit and Kerbel, 2004). Per aquest motiu, vam voler investigar l'existència de canvis en el genoma com un possible origen de resistència a cetuximab, mecanisme que, en el nostre coneixement, no s'ha reportat prèviament. Vam determinar si la resistència estava lligada a la selecció de cèl·lules amb un major nombre de còpies del gen d'*EGFR* i/o per una acumulació d'aberracions cromosòmiques que afavorissin la supervivència cel·lular. La hipòtesi que vam avaluar, doncs, va ser si l'exposició continuada a cetuximab en una població heterogènia (com la de la línia A431), podria conduir a un enriquiment de cèl·lules insensibles seguint un patró darwinianà. Les hibridacions genòmiques (CGH) realitzades no van mostrar en cap cas l'existència de guanys o pèrdues atribuïbles a la resistència a cetuximab, però tampoc a la radiació o al tractament combinat. Concretament, la regió on es localitza el gen d'*EGFR* (7p11.2) no va presentar canvis, ni tampoc la resta del genoma. Podem argumentar que la hipòtesi de partida no es va confirmar perquè l'anàlisi citogenètic es va realitzar en cèl·lules sotmeses a una pressió selectiva insuficient (dosi i temps d'exposició). En aquest sentit, caldria avaluar en cèl·lules A431 que presenten resistència estable a cetuximab l'existència de canvis genòmics a nivell d'*EGFR*. En qualsevol cas, però, no es pot descartar una manca de sensibilitat de la tècnica enfront a canvis citogenètics per sota de 5-10 Mb.

Finalment, és important tenir en compte que mitjançant aquest disseny experimental no és possible estimar el percentatge de cèl·lules que van ser eradicades pel tractament durant el cultiu (abans de l'assaig clonogènic) i que només vam obtenir dades de les que van sobreviure. Així, es podria interpretar que el número total de cèl·lules eradicades amb el tractament va ser superior al que es pot deduir dels resultats experimentals.

## 2.- *In vivo*. L'eficàcia de cetuximab va ser similar en tots els esquemes

Una de les troballes més interessants (que es discutiran més endavant) és que els tumors derivats de cèl·lules irradiades implantades en ratolins tractats amb sèrum fisiològic van créixer significativament més ràpid que els que derivaven de cèl·lules sense irradiar i que va ser en aquests tumors on es va observar una resposta més potent. Crida l'atenció, però, que el pretractament *in vitro* amb cetuximab no va alentir el creixement tumoral, posant en dubte tant el paper motor de l'EGFR en el creixement tumoral post-radioteràpia, com l'eficàcia de l'anticòs. Diferents arguments podrien explicar aquesta observació. 1) La inducció per la radiació d'altres vies, a més de la d'EGFR, que estimulin la proliferació cel·lular; 2) la insensibilització a cetuximab *in vitro*, i 3) un efecte *feeder cell* degut al diferent nombre de cèl·lules implantades. A aquests possibles factors es podria afegir el desconeixement del paper de la interacció entre tumor i estroma i la manca de dades sobre la reversibilitat del bloqueig en la transició entre el cultiu cel·lular i la injecció en el teixit subcutani.

### **Les cèl·lules tumorals A431 que sobreviuen a la radioteràpia originen tumors més agressius que les cèl·lules A431 no irradiades**

Tal com dèiem en la secció anterior, una de les troballes més interessants de l'estudi va ser l'observació de que els tumors que provenien de cèl·lules irradiades (en combinació o no amb cetuximab) presentaven un creixement més ràpid respecte als que provenien de cèl·lules no irradiades. A més del creixement accelerat, aquesta subpoblació irradiada va originar tumors amb un índex de proliferació (Ki67) i una angiogènesi (MVD) amb valors significativament per sobre dels tumors control. En conjunt, aquests resultats van ser compatibles amb la inducció d'un fenotip tumoral agressiu en resposta a la irradiació executat per la fracció de cèl·lules que mimetitzaria la MMR post-radioteràpia. Aquesta resposta estaria, en general, orquestrada per l'activació de programes genètics (evolutivament seleccionats) destinats a protegir la persistència d'una població cel·lular determinada. En el nostre cas, va ser suggestiu que les cèl·lules A431 podrien haver activat almenys la via de transducció de senyals de l'EGFR en resposta a la irradiació. Vam hipotetitzar-ho així donat que l'efecte del bloqueig de l'EGFR *in vivo* va ser més intens en els tumors procedents de cèl·lules irradiades. A nivell biològic, la hipòtesi d'una resposta radioinduída vehiculitzada per EGFR o per alguna altra oncoproteïna es debilita per la interferència derivada del nombre total de cèl·lules implantades (efecte *feeder cell*). Amb la intenció valoritzar la hipòtesi esmentada vam realitzar experiments abans de la injecció de les cèl·lules, avaluant així l'activació d'EGFR per la radiació ionitzant (independent d'un efecte associat al propi tumor: efecte *feeder* i estroma) com a mecanismes de citoprotecció.

### La radiació ionitzant va activar mecanismes de citoprotecció relacionats amb la via de senyalització de l'EGFR

La inducció d'agressivitat en els tumors per la radiació ionitzant s'ha descrit en altres treballs (Bozec et al., 2008; Schmidt-Ullrich et al., 1997). També s'han descrit propietats similars en *cancer stem cells* resistents a radioteràpia (Bao et al., 2006a; Bao et al., 2006b). Es coneix que les cèl·lules irradiades tenen l'habilitat d'activar mecanismes citoprotectors com a resposta adaptativa als efectes tòxics de la radiació; una vegada desencadenats aquests mecanismes, el tractament radioteràpic pot resultar infructuós. El fracàs degut a la radioteràpia prolongada s'ha relacionat amb un creixement tumoral accelerat radioinduït a través de la via d'EGFR (Schmidt-Ullrich, 2003). Un dels principals mecanismes responsables és la senyalització directa provocada per la radiació ionitzant, incloent l'activació de l'EGFR independent de lligand, la fosforil·lació de membres de la família Src i la sobreexpressió de VEGF (Gorski et al., 1999; Kharbanda et al., 1994; Schmidt-Ullrich, 2003).

En el model utilitzat, hem observat que les cèl·lules A431 presenten la proteïna ERK 1/2 persistentment activada en resposta a la irradiació fraccionada. És possible que les cèl·lules pERK 1/2(+), més resistents al tractament, sobrevisquessin amplificant el fenotip resistent-agressiu fins a dominar els cultius. Aquesta idea es veu reforçada per dos resultats més: 1) tant la transcripció del gen de l'EGFR com la d'un dels seus lligands, *TGF- $\alpha$* , es va trobar augmentada i 2) la irradiació va estimular la secreció de VEGF. La sobreexpressió de la via de l'EGFR-ERK 1/2, i indirectament de la secreció de VEGF, confirmaria que les cèl·lules irradiades van presentar un avantatge pel que fa al creixement tumoral. Sembla raonable concloure que en aquest model experimental la radiació va activar la via de senyalització de l'EGFR-ERK 1/2, regulant a l'alça la síntesi de factors implicats en la proliferació i que explicarien per sí mateixos les troballes experimentals de creixement accelerat (tant a nivell de mida tumoral com de nivells de Ki67) i d'angiogènesi.

Que la resposta induïda per la radiació va dependre en part de l'EGFR es va acabar de confirmar per la inhibició del fenotip agressiu mitjançant cetuximab. L'administració de l'anticòs *in vivo* va inhibir els mecanismes moleculars implicats en la resposta citotòxica a la radiació ionitzant, ja que va comportar una disminució en l'activació de pERK 1/2, l'expressió d'EGFR i *TGF- $\alpha$*  i la secreció de VEGF. L'addició a la senyalització dependent d'EGFR mostrada post-irradiació suggereix una major vulnerabilitat i potencial sensibilitat als tractaments anti-EGFR.

### Angiogènesi i EGFR

La relació entre angiogènesi i EGFR a través de VEGF en el nostre model cal discutir-la més extensament. Els resultats mostren que la irradiació va induir nivells elevats de VEGF que explicarien l'augment de la densitat vascular (MVD). Aquests resultats estan en concordança amb la literatura ja que la secreció de VEGF s'ha vist associada a la irradiació en altres estudis (Gorski et al., 1999) i, indirectament, a l'EGFR (Goldman et al., 1993). La inhibició de la secreció de VEGF per cetuximab tant en aquest treball com en altres avala la relació entre l'estimulació d'EGFR i VEGF (Ciardiello et al., 2001; Martens et al., 2008).

S'ha suggerit la inhibició de l'angiogènesi com un dels mecanismes d'acció antitumoral de cetuximab. El bloqueig del receptor de l'EGF inhibiria secundàriament la secreció de VEGF i el procés angiogènic. En el nostre estudi el tractament dels ratolins amb cetuximab va disminuir la vascularització dels tumors al mateix temps que va alentir el creixement. A diferència d'altres treballs (Huang and Harari, 2000), vam poder demostrar una disminució de MVD sense la interferència de la irradiació de l'estroma permetent l'associació entre angiogènesi i EGFR, tant en quant a l'activació com al bloqueig per radiació o cetuximab, respectivament.

### **Aspectes controvertits**

Alguns experiments realitzats per intentar respondre a preguntes o observacions biològiques en relació als tractaments van donar resultats negatius. En aquesta secció s'ha fet una revisió crítica d'aquestes troballes.

### Cetuximab no va induir apoptosi

Es coneix que cetuximab pot provocar apoptosi, mecanisme involucrat en la inhibició del creixement tumoral. En el nostre cas, no vam observar indicis d'apoptosi en els xenoempeles, ni en els estadis inicials ni en els finals del creixement tumoral. Una possible explicació és que les cèl·lules A431 tumorogèniques serien resistents a l'apoptosi ja en els controls. Són amplis els estudis que han correlacionat una disminució de factors proangiogènics (com VEGF o IL-8) amb un increment de l'apoptosi de les cèl·lules endotelials en xenoempeles humans (Baumann et al., 2007; Mendelsohn and Baselga, 2003; Perrotte et al., 1999), resultats que tampoc vam observar en el nostre estudi. Una dosificació inferior a la d'aquests estudis (com la que vam usar en el nostres experiments) podria explicar la manca d'apoptosi observada.

### No es va identificar infiltració per macròfags associats a tumor

A més de les alteracions en la cèl·lula tumoral, aquelles que es donen en l'ambient que l'envolta tenen un efecte sobre el creixement i la progressió en estadis primerencs i intermitjos de la malaltia. El component estromal inherent al teixit que inicia el procés cancerigen és important, però els components alterats o reclutats per les cèl·lules tumorals pot ser igualment crític. Així, la infiltració dels tumors per macròfags és freqüent i s'ha correlacionat amb agressivitat tumoral i mal pronòstic (Bingle et al., 2002). La inflamació crònica, mantinguda en part per la presència de macròfags atrets pels antígens tumorals, promou l'autosuficiència de senyals i pot contribuir al fenotip maligne. A més de la inflamació també s'ha descrit l'existència de bucles paracrins que esclavitzen als macròfags en pro de les cèl·lules tumorals. S'ha identificat que la secreció d'EGF per macròfags associats a tumor pot ser induïda paracrinament per cèl·lules de càncer de mama (Wyckoff et al., 2004). En el nostre estudi no vam observar una presència significativa de macròfags en els xenoempelts, fet que ens fa suposar la inexistència d'aquest bucle paracrí en aquest model.

La participació de l'estroma en la tumorigènesi (excepte pel que fa a l'endoteli) va ser inexistent ja que no es va detectar expressió murina d'*EGFR*, *VEGF*, *TGF- $\alpha$*  i *HIF-1 $\alpha$* . Els fibroblasts també poden jugar un paper important en la promoció tumoral a nivell d'alliberació de factors de creixement, però no ho vam poder observar. Per confirmar la manca de participació dels fibroblasts s'hauria pogut realitzar una estudi immunohistoquímic per esbrinar la presència de cèl·lules amb possibles lligands.

### L'antecedent d'irradiació i l'expressió d'*HIF-1 $\alpha$* no es van associar

L'angiogènesi està regulada pels nivells d'oxigen tissular, tot i que paradògicament, en ocasions els vasos formats de nou (disfuncionals) provoquen situacions d'hipòxia. La hipòxia regula els nivells intracel·lulars de la proteïna HIF-1 $\alpha$ , que en condicions de bona oxigenació es degrada immediatament després de la seva síntesis. HIF-1 $\alpha$  es dimeritza amb HIF-1 $\beta$  per formar un complex que actua com a factor de transcripció de múltiples proteïnes implicades en mecanismes de citoprotecció, entre elles el VEGF. Els nivells de mRNA de VEGF augmenten dràsticament en resposta a la falta d'oxigen, i retornen a la normalitat durant la reoxigenació *in vitro* (Shweiki et al., 1992). La hipòxia, via HIF-1 $\alpha$ , està associada a l'agressivitat tumoral en forma de resistència a l'apoptosi, invasió local, metastàsica i angiogènesi. La positivitats d'HIF-1 $\alpha$  en anàlisis immunohistoquímiques s'ha observat en tumors humans, mentre que no es troba en teixits normals (Zhong et al., 1999), i la seva sobreexpressió s'ha correlacionat amb pitjor

pronòstic en múltiples tipus de càncer (Beasley et al., 2002; Dales et al., 2005; Lidgren et al., 2005).

En el nostre model, no vam poder associar la radiació amb un augment de la transcripció del gen *HIF-1α*. Creiem que estava justificada l'exploració dels nivells d'*HIF-1α*, independentment de la hipòxia, doncs la radiació podria modular HIF-1α de la mateixa manera que ho fa en l'activació dual d'H2AX: per hipòxia i per radiació. Un altre abordatge que no vam culminar va ser el seu estudi histològic, el qual podria haver demostrat una relació entre el paper citoprotector d'*HIF-1α*, el fenotip agressiu i la radioteràpia.

Recentment s'ha demostrat que el tractament de cèl·lules tumorals amb cetuximab disminueix els nivells de la proteïna HIF-1α (Lu et al., 2007b; Luwor et al., 2005). En el nostre estudi, en el cas dels tumors en estadis avançats, es va observar una tendència a la disminució en l'expressió d'*HIF-1α* quan es va administrar cetuximab als ratolins amb xenoempelts derivats de cèl·lules irradiades o tractades amb cetuximab. És probable que la falta de resposta es doni perquè vam realitzar l'anàlisi d'*HIF-1α* a nivell transcripcional, i la regulació d'*HIF-1α* ve donada principalment pel control post-traducciona. Per aquest motiu s'hauria de completar l'estudi amb la detecció dels nivells de la proteïna.

#### No es van observar diferències en la densitat vascular en tumors grans ( $\approx 1000\text{mm}^3$ )

En els tumors grans, les diferències en els valors de MVD es van igualar entre tractaments, suggerint que les cèl·lules van evadir finalment l'acció anti-angiogènica inicial de cetuximab. En aquest estadi final ja s'hauria desenvolupat la vasculatura (i els mecanismes corresponents) necessària per nodrir i donar suport als tumors d'aquesta mida.

#### **Estratègies farmacològiques que podrien potenciar la combinació de cetuximab i radioteràpia**

Finalment, no volia acabar aquesta secció sense un comentari sobre com contrarestar la resistència a la combinació dels dos agents. La resistència a cetuximab ha estat associada amb l'expressió de VEGF i una elevada activitat Src quinasa, ambdós proteïnes estimulades per la radiació ionitzant (Schmidt-Ullrich et al., 1997; Vioria-Petit and Kerbel, 2004). El bloqueig concomitant d'altres vies o mecanismes citoprotectors podria potenciar els efectes de la combinació cetuximab-radioteràpia. L'anticòs anti-VEGF bevacizumab en combinació amb radioteràpia i quimioteràpia en el tractament de càncer colorectal (Willett et al., 2004) i de cap



i coll (Thariat et al., 2007) ha donat bons resultats, els quals es podrien ampliar a la combinació amb cetuximab.

Una altra alternativa podria ser el bloqueig conjunt de SRC. SRC és una proteïna tirosina-quinasa que està involucrada en diferents vies de senyalització, entre elles les mediades pels membres de la família d'EGFR. Src és capaç de fosforil·lar diferents tirosines específiques d'EGFR i promocionar l'oncogènesi (Stover et al., 1995; Tice et al., 1999), a més de provocar la internalització del receptor al nucli generant així una resistència al tractament amb cetuximab. Dasatinib és una molècula de baix pes molecular dirigida contra el lloc d'unió d'ATP de les proteïnes de la família de Src, i s'ha demostrat que atura el creixement cel·lular en models de càncer de pulmó resistents a la inhibició d'EGFR (Johnson et al., 2005; Song et al., 2006). De la mateixa manera s'ha observat l'existència de sinergisme entre inhibidors de Src i cisplatí, gemcitabina, docetaxel i imatinib (Fizazi, 2007). En aquest cas, també es podria provar l'eficàcia en combinació amb cetuximab.



# Conclusions



1. L'administració de cetuximab inhibeix parcialment el creixement de xenoempelts derivats de cèl·lules A431 prèviament irradiades *in vitro*.
2. Els tumors derivats de cèl·lules A431 irradiades presenten un fenotip més agressiu que els tumors derivats de cèl·lules no irradiades. La causa d'aquest fenotip agressiu pot atribuir-se a una resposta citoprotectora induïda per la radioteràpia, tot i que no es pot descartar un efecte *feeder cell*.
3. La radiació ionitzant indueix directament l'activació de la proteïna ERK, promou la transcripció de l'EGFR i del seu lligand TGF- $\alpha$  i estimula la secreció de VEGF en les cèl·lules A431. Aquestes troballes són compatibles amb una resposta citoprotectora induïda per la radioteràpia.
4. A més de la inhibició del creixement dels xenoempelts cetuximab inhibeix el fenotip agressiu tant a nivell tissular com molecular, fet que relaciona específicament els canvis biològics radioinduits amb la senyalització cel·lular dependent d'EGFR.
5. Les cèl·lules A431 en cultiu es desensibilitzen enfront a cetuximab. Aquesta resistència no s'associa a canvis en el genoma avaluades per tècniques de FISH i CGH.
6. Els resultats de l'estudi avalen la continuïtat d'assaigs clínics per avaluar si el manteniment de l'anticòs cetuximab una vegada finalitzada la radioteràpia incrementa la taxa de curacions i/o augmenta el temps lliure de malaltia en malalts amb tumors dependents d'EGFR.



# **Bibliografia**





**A**

- Abbott, A. (2006). "Cancer: the root of the problem." Nature **442**(7104): 742-3.
- Adams, J. M. and A. Strasser (2008). "Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?" Cancer Res **68**(11): 4018-21.
- Akimoto, T., N. R. Hunter, et al. (1999). "Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas." Clin Cancer Res **5**(10): 2884-90.
- Albanell, J., J. Codony-Servat, et al. (2001). "Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments." Cancer Res **61**(17): 6500-10.
- Ang, K. K., B. A. Berkey, et al. (2002). "Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7350-6.
- Arribas, J. and A. Borroto (2002). "Protein ectodomain shedding." Chem Rev **102**(12): 4627-38.

**B**

- Baselga, J. and C. L. Arteaga (2005). "Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer." J Clin Oncol **23**(11): 2445-59.
- Baumann, M. (2006). "Keynote comment: Radiotherapy in the age of molecular oncology." Lancet Oncol **7**(10): 786-7.
- Baumann, M., M. Krause, et al. (2008). "Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance." Nat Rev Cancer **8**(7): 545-54.
- Bentzen, S. M., B. M. Atasoy, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial." J Clin Oncol **23**(24): 5560-7.
- Bernier, J., S. M. Bentzen, et al. (2009). "Molecular therapy in head and neck oncology." Nat Rev Clin Oncol **6**(5): 266-77.
- Bhattacharya, A., K. Toth, et al. (2004). "Lack of microvessels in well-differentiated regions of human head and neck squamous cell carcinoma A253 associated with functional

- magnetic resonance imaging detectable hypoxia, limited drug delivery, and resistance to irinotecan therapy." Clin Cancer Res **10**(23): 8005-17.
- Biscardi, J. S., M. C. Maa, et al. (1999). "c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function." J Biol Chem **274**(12): 8335-43.
- Boerner, J. L., A. Danielsen, et al. (2003). "Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm." Exp Cell Res **284**(1): 111-21.
- Bonner, J. A., P. M. Harari, et al. (2006). "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **354**(6): 567-78.
- Bonner, J. A., K. P. Raisch, et al. (2000). "Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers." J Clin Oncol **18**(21 Suppl): 47S-53S.
- Brown, J. M. and W. R. Wilson (2004). "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment." Nat Rev Cancer **4**(6): 437-47.
- Bruns, C. J., M. T. Harbison, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms." Clin Cancer Res **6**(5): 1936-48.
- Buffa, F. M., S. M. Bentzen, et al. (2004). "Molecular marker profiles predict locoregional control of head and neck squamous cell carcinoma in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy." Clin Cancer Res **10**(11): 3745-54.

## C

- Cappuzzo, F., G. Finocchiaro, et al. (2008). "EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients." Ann Oncol **19**(4): 717-23.
- Ceresa, B. P. and S. L. Schmid (2000). "Regulation of signal transduction by endocytosis." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 204-10.
- Ciardiello, F., R. Bianco, et al. (1999). "Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225." Clin Cancer Res **5**(4): 909-16.
- Ciardiello, F. and G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." N Engl J Med **358**(11): 1160-74.

- Conway, E. M., D. Collen, et al. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res **49**(3): 507-21.
- Ch'ng, S., I. Low, et al. (2008). "Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma." Hum Pathol **39**(3): 344-9.
- Chen, D. J. and C. S. Nirodi (2007). "The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage." Clin Cancer Res **13**(22 Pt 1): 6555-60.
- Chiang, W. F., S. Y. Liu, et al. (2008). "Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number amplification with neck lymph node metastasis in areca-associated oral carcinomas." Oral Oncol **44**(3): 270-6.
- Chung, C. H., K. Ely, et al. (2006). "Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas." J Clin Oncol **24**(25): 4170-6.

**D**

- Dent, P., D. B. Reardon, et al. (1999). "Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death." Mol Biol Cell **10**(8): 2493-506.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **280**(35): 31182-9.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2009). "Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport." Radiother Oncol.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity." Radiother Oncol **76**(2): 157-61.
- Economopoulou, M., H. F. Langer, et al. (2009). "Histone H2AX is integral to hypoxia-driven neovascularization." Nat Med **15**(5): 553-8.

## E

- Eriksen, J. G., T. Steiniche, et al. (2005). "The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study." Radiother Oncol **74**(2): 93-100.
- Eyler, C. E. and J. N. Rich (2008). "Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis." J Clin Oncol **26**(17): 2839-45.

## F

- Fan, Z., J. Baselga, et al. (1993). "Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." Cancer Res **53**(19): 4637-42.
- Ferlay, J., P. Autier, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol **18**(3): 581-92.
- Folkman, J. (1992). "The role of angiogenesis in tumor growth." Semin Cancer Biol **3**(2): 65-71.
- Folkman, J. (2007). "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" Nat Rev Drug Discov **6**(4): 273-86.
- Foulds, L. (1957). "Tumor progression." Cancer Res **17**(5): 355-6.
- Franklin, W. A., R. Veve, et al. (2002). "Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy." Semin Oncol **29**(1 Suppl 4): 3-14.
- Freier, K., C. Flechtenmacher, et al. (2005). "Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis." Cancer Genet Cytogenet **159**(1): 89-95.

## G

- Garrett, T. P., N. M. McKern, et al. (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." Cell **110**(6): 763-73.

- Greijer, A. E., P. van der Groep, et al. (2005). "Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)." J Pathol **206**(3): 291-304.
- Grunwald, V. and M. Hidalgo (2003). "Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment." J Natl Cancer Inst **95**(12): 851-67.
- Gschwind, A., S. Hart, et al. (2003). "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells." Embo J **22**(10): 2411-21.

## H

- Haffty, B. G. and P. M. Glazer (2003). "Molecular markers in clinical radiation oncology." Oncogene **22**(37): 5915-25.
- Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, et al. (1994). "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis." J Exp Med **180**(2): 525-35.
- Hall, E. J. (2000). "Radiobiology for the radiologist (5th edition)." Lippincott Williams & Wilkins.
- Hanada, N., H. W. Lo, et al. (2006). "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor." Mol Carcinog **45**(1): 10-7.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harari, P. M. (2004). "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology." Endocr Relat Cancer **11**(4): 689-708.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.
- Harrison, L. and K. Blackwell (2004). "Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?" Oncologist **9 Suppl 5**: 31-40.
- Helleday, T., J. Lo, et al. (2007). "DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment." DNA Repair (Amst) **6**(7): 923-35.
- Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." Int J Radiat Oncol Biol Phys **59**(2 Suppl): 21-6.
- Hirsch, F. R., R. S. Herbst, et al. (2008). "Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy." J Clin Oncol **26**(20): 3351-7.

- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-76.
- Huang, S. M., J. M. Bock, et al. (1999). "Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Res **59**(8): 1935-40.
- Huang, S. M. and P. M. Harari (2000). "Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis." Clin Cancer Res **6**(6): 2166-74.
- Hung, L. Y., J. T. Tseng, et al. (2008). "Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression." Nucleic Acids Res **36**(13): 4337-51.
- Hynes, N. E., K. Horsch, et al. (2001). "The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators." Endocr Relat Cancer **8**(3): 151-9.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-54.
- Hynes, N. E. and G. Macdonald (2009). "ErbB receptors and signaling pathways in cancer." Curr Opin Cell Biol.

## I

- Inoue, K., J. W. Slaton, et al. (2000). "Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma." Clin Cancer Res **6**(12): 4874-84.

## J

- Janssen, H. L., K. M. Haustermans, et al. (2005). "Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important?" Head Neck **27**(7): 622-38.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman, et al. (2006). "Cancer stem cells." N Engl J Med **355**(12): 1253-61.

**K**

- Keith, B. and M. C. Simon (2007). "Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer." Cell **129**(3): 465-72.
- Kerbel, R. and J. Folkman (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." Nat Rev Cancer **2**(10): 727-39.
- Kerbel, R. S. (2008). "Tumor angiogenesis." N Engl J Med **358**(19): 2039-49.
- Kolesnick, R. and Z. Fuks (2003). "Radiation and ceramide-induced apoptosis." Oncogene **22**(37): 5897-906.
- Krause, M., D. Zips, et al. (2006). "Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy." Radiother Oncol **80**(2): 112-22.

**L**

- Lammering, G., K. Valerie, et al. (2004). "Radiation-induced activation of a common variant of EGFR confers enhanced radioresistance." Radiother Oncol **72**(3): 267-73.
- Landau, M., S. J. Fleishman, et al. (2004). "A putative mechanism for downregulation of the catalytic activity of the EGF receptor via direct contact between its kinase and C-terminal domains." Structure **12**(12): 2265-75.
- Lee, H. C., S. An, et al. (2008). "Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation." Mol Cancer Res **6**(6): 996-1002.
- Li, C., M. Iida, et al. (2009). "Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab." Oncogene.
- Lin, S. Y., K. Makino, et al. (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." Nat Cell Biol **3**(9): 802-8.
- Liu, B., M. Fang, et al. (2000). "Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity." Br J Cancer **82**(12): 1991-9.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, et al. (2005). "Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway." Cancer Cell **7**(6): 575-89.

Lo, H. W. and M. C. Hung (2006). "Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival." Br J Cancer **94**(2): 184-8.

Lynch, T. J., D. W. Bell, et al. (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." N Engl J Med **350**(21): 2129-39.

## M

Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-66.

Mandic, R., C. J. Rodgarkia-Dara, et al. (2006). "Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor." FEBS Lett **580**(20): 4793-800.

Melillo, G. (2006). "Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy." Mol Cancer Res **4**(9): 601-5.

Mendelsohn, J. (2002). "Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy." J Clin Oncol **20**(18 Suppl): 1S-13S.

Mendelsohn, J. and J. Baselga (2003). "Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer." J Clin Oncol **21**(14): 2787-99.

Mendelsohn, J. and C. P. Dinney (2001). "The Willet F. Whitmore, Jr., Lectureship: blockade of epidermal growth factor receptors as anticancer therapy." J Urol **165**(4): 1152-7.

Mikkelsen, R. B. and P. Wardman (2003). "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms." Oncogene **22**(37): 5734-54.

Milas, L., T. Akimoto, et al. (2002). "Relationship between cyclin D1 expression and poor radioresponse of murine carcinomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **52**(2): 514-21.

Milas, L., K. Mason, et al. (2000). "In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody." Clin Cancer Res **6**(2): 701-8.

Moroni, M., S. Veronese, et al. (2005). "Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to anti-EGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study." Lancet Oncol **6**(5): 279-86.



## N

- Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S9-15.
- Nordsmark, M., S. M. Bentzen, et al. (2005). "Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study." Radiother Oncol **77**(1): 18-24.
- Normanno, N., C. Bianco, et al. (2003). "Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment." Endocr Relat Cancer **10**(1): 1-21.
- Nowell, P. C. (1986). "Mechanisms of tumor progression." Cancer Res **46**(5): 2203-7.
- Nowell, P. C. (2002). "Tumor progression: a brief historical perspective." Semin Cancer Biol **12**(4): 261-6.

## O

- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-87.
- Olayioye, M. A., D. Graus-Porta, et al. (1998). "ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner." Mol Cell Biol **18**(9): 5042-51.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." Embo J **19**(13): 3159-67.
- Overholser, J. P., M. C. Prewett, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice." Cancer **89**(1): 74-82.

## P

- P, O. c., H. Modjtahedi, et al. (2000). "Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells." Cancer Res **60**(4): 1121-8.

- P, O. c., P. Rhys-Evans, et al. (1999). "Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands." Clin Exp Metastasis **17**(7): 631-9.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-500.
- Pao, W. and V. A. Miller (2005). "Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions." J Clin Oncol **23**(11): 2556-68.
- Pedersen, M. W., M. Meltorn, et al. (2001). "The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy." Ann Oncol **12**(6): 745-60.
- Pedersen, M. W., N. Pedersen, et al. (2005). "Analysis of the epidermal growth factor receptor specific transcriptome: effect of receptor expression level and an activating mutation." J Cell Biochem **96**(2): 412-27.
- Peng, D., Z. Fan, et al. (1996). "Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145." Cancer Res **56**(16): 3666-9.
- Pepper, C., T. Hoy, et al. (1997). "Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance." Br J Cancer **76**(7): 935-8.
- Perrotte, P., T. Matsumoto, et al. (1999). "Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice." Clin Cancer Res **5**(2): 257-65.
- Petersen, C., W. Eicheler, et al. (2003). "Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice." Int J Radiat Biol **79**(7): 469-77.
- Petersen, C., D. Zips, et al. (2001). "Repopulation of FaDu human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(2): 483-93.
- Petit, A. M., J. Rak, et al. (1997). "Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors." Am J Pathol **151**(6): 1523-30.
- Phillips, T. M., W. H. McBride, et al. (2006). "The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation." J Natl Cancer Inst **98**(24): 1777-85.

Puck, T. T., P. I. Marcus, et al. (1956). "Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer." J Exp Med **103**(2): 273-83.

## R

Rich, J. N. (2007). "Cancer stem cells in radiation resistance." Cancer Res **67**(19): 8980-4.

Robinson, D. R., Y. M. Wu, et al. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." Oncogene **19**(49): 5548-57.

Rodemann, H. P., M. Baumann, et al. (2004). "Molecular radiation biology/oncology." Radiother Oncol **72**(3): 247-9.

Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, et al. (1996). "Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer **78**(6): 1284-92.

## S

Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." J Biol Chem **272**(36): 22642-7.

Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit Rev Oncol Hematol **19**(3): 183-232.

Sartore-Bianchi, A., M. Moroni, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab." J Clin Oncol **25**(22): 3238-45.

Schmidt-Ullrich, R. K., J. N. Contessa, et al. (1999). "Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation." Radiat Oncol Investig **7**(6): 321-30.

Schmidt-Ullrich, R. K., J. N. Contessa, et al. (2003). "ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses." Oncogene **22**(37): 5855-65.

Schmidt-Ullrich, R. K., R. B. Mikkelsen, et al. (1997). "Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation." Oncogene **15**(10): 1191-7.

- Schmidt-Ullrich, R. K., K. Valerie, et al. (1996). "Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells." Radiat Res **145**(1): 81-5.
- Schmidt-Ullrich, R. K., K. C. Valerie, et al. (1994). "Altered expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures." Int J Radiat Oncol Biol Phys **29**(4): 813-9.
- Sheu, J. J., C. H. Hua, et al. (2009). "Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma." Cancer Res **69**(6): 2568-76.
- Simeonova, P. P., S. Wang, et al. (2002). "c-Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway by arsenic. Role in carcinogenesis." J Biol Chem **277**(4): 2945-50.
- Singh, A. B. and R. C. Harris (2005). "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands." Cell Signal **17**(10): 1183-93.
- Sok, J. C., F. M. Coppelli, et al. (2006). "Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting." Clin Cancer Res **12**(17): 5064-73.

## T

- Thariat, J., L. Milas, et al. (2007). "Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(4): 974-84.
- Tortora, G., R. Caputo, et al. (1999). "Cooperative inhibitory effect of novel mixed backbone oligonucleotide targeting protein kinase A in combination with docetaxel and anti-epidermal growth factor-receptor antibody on human breast cancer cell growth." Clin Cancer Res **5**(4): 875-81.
- Toulany, M., K. Dittmann, et al. (2005). "Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS." Radiother Oncol **74**(2): 117-29.
- Toulany, M., K. Dittmann, et al. (2005). "Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway." Radiother Oncol **76**(2): 143-50.

## V

- Vaupel, P., A. Mayer, et al. (2003). "Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers." Cancer Res **63**(22): 7634-7.
- Vincent T.De Vita, J., S. Hellman, et al. (1997). "CANCER. Principles and practice of Oncology (5th Edition)." Lippincott-Raven.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-99.

## W

- Wang, S. C., Y. Nakajima, et al. (2006). "Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability." Nat Cell Biol **8**(12): 1359-68.
- Watters, D. (1999). "Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis." Immunol Cell Biol **77**(3): 263-71.
- Withers, H. R., J. M. Taylor, et al. (1988). "The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy." Acta Oncol **27**(2): 131-46.
- Wu, X., Z. Fan, et al. (1995). "Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin." J Clin Invest **95**(4): 1897-905.
- Wu, X., M. Rubin, et al. (1996). "Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody." Oncogene **12**(7): 1397-403.

## Y

- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.

## Z

- Zandi, R., A. B. Larsen, et al. (2007). "Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor." Cell Signal **19**(10): 2013-23.
- Zhang, X., J. Gureasko, et al. (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." Cell **125**(6): 1137-49.
- Zimmermann, M., A. Zouhair, et al. (2006). "The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications." Radiat Oncol **1**: 11.
- Zips, D., M. Krause, et al. (2008). "Epidermal growth factor receptor inhibitors for radiotherapy: biological rationale and preclinical results." J Pharm Pharmacol **60**(8): 1019-28.



